

A composição fenólica e a deteção precoce da compatibilidade da enxertia em *Vitis* spp.

Jorge Miguel Alves Pinheiro

Mestrado em Viticultura e Enologia

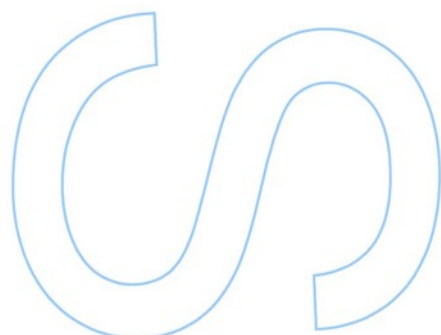
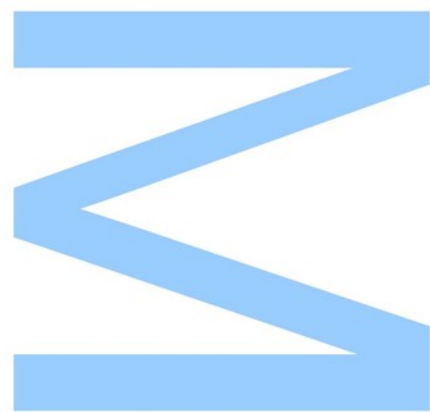
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território

Orientador

Sara Maria de Almeida Lopes Canas, Investigadora Auxiliar com Agregação, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Coorientador

Jorge Bernardo Lacerda de Queiroz, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

N

S

O

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero deixar o meu agradecimento à Doutora Sara Canas, pelo facto de ter aceite ser orientadora desta dissertação. Pela compreensão que demonstrou ao longo deste processo e pelos conhecimentos que me transmitiu e sem os quais não teria sido possível concluir este trabalho.

Quero também agradecer ao Professor Doutor Jorge Queiroz, que como diretor do Curso de Especialização em Viticultura e Enologia sempre esteve disponível para resolver qualquer questão que foi surgindo ao longo de todo o processo. E pelo facto de ter aceite ser co-orientador deste trabalho.

Agradeço também a todos os meus amigos todo o incentivo que me deram, e desde já quero a todos pedir desculpa pelas minhas faltas de disponibilidade resultantes do meu envolvimento com este caminho que se iniciou em 2014.

A todos o meu profundo reconhecimento.

Resumo

A falta de compatibilidade de enxertia é um problema que, além do prejuízo económico provocado aos viveiristas e viticultores, origina atraso no lançamento no mercado de plantas certificadas de novas cultivares e/ou porta-enxertos, devido ao longo período de tempo necessário para os testes de compatibilidade. É um fenómeno complexo, que envolve interações anatómicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares entre a casta e o porta-enxerto. Por esta razão, torna-se um problema complicado de estudar. Porém, acredita-se que através de uma análise dos tecidos de videira, nomeadamente dos conteúdos de compostos fenólicos, se pode avançar mais rapidamente no conhecimento deste fenómeno.

A variação das quantidades dos compostos fenólicos nos tecidos vegetais encontra-se já estudada em diferentes espécies de fruteiras. Contudo, a informação disponível para espécies *Vitis* é escassa, embora esteja já descrito e validado um método para realizar a quantificação de compostos fenólicos nos enxertos-prontos de videira. O objetivo deste trabalho é confirmar a utilidade de alguns ácidos fenólicos (gálico, ferúlico, clorogénico, cafeico e sinápico) e de dois flavanóis (catequina e epicatequina) como marcadores da compatibilidade da enxertia em espécies *Vitis*, nas combinações de porta-enxerto 110 R com garfos da casta Touriga Nacional de dois clones (TN 21 and TN 112). Para o efeito, foram analisados tecidos de *Vitis vinífera*, em três locais próximos da união de enxertia, em três estádios diferentes do ciclo de enxertia: calogénese, enraizamento e final de ciclo. Os tecidos foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), para determinar o conteúdo dos ácidos fenólicos e flavanóis presentes. Verificou-se que três dos sete compostos analisados, diferenciavam as duas combinações casta/porta-enxerto. No entanto, apenas o ácido sinápico poderá funcionar como marcador químico da compatibilidade de enxertia.

Palavras-chave: *Vitis vinífera*, porta-enxerto, enxertia, compatibilidade, compostos fenólicos.

Abstract

The graft incompatibility is a problem that causes economic loss to nurserymen and viticulturist, causes delay in the market launch of certified plants of new cultivars and / or rootstocks, due to the long period of time required for the compatibility tests. It is a complex phenomenon, involving anatomical, physiological, biochemical and molecular interactions between the cultivar-canopy and the rootstock. Being, for this reason, a complicated problem to study. However, it is believed that through a joint analysis of the different mechanisms of incompatibility, one can advance more quickly in the knowledge of this phenomenon.

The variation of the phenolic compounds in the grafting compatibility is already well studied in different species of fruit trees. However, the information available for *Vitis* species is, scarce although a method for doing this analysis on vine grafts is already described and validated. The objective of this work is to confirm the use of some phenolic acids and two flavanols as graft compatibility markers in *Vitis* species for the combination of the 110 R graft with two Portuguese Touriga Nacional (TN 21 and TN 112) clones. For this purpose, extracts of grafting tissues were prepared from three different locations, all close to the grafting union, and these extracts were analyzed in three different stages of the grafting cycle: calogenesis, rooting and final cycle. Tissues were analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC) to determine the content of phenolic acids and flavanols present. It was found that three of the seven compounds analyzed differentiated the two *Vitis vinifera* / rootstock combinations. However, only sinapic acid can act as a chemical marker of graft compatibility

Keywords: *Vitis vinifera*, grafting, graft, rootstock, compatibility, phenolic compounds.

Lista de Abreviaturas

Cromatografia Líquida de Alta Resolução	HPLC
Touriga Nacional	TN
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária	INIAV
Ultravioleta	UV
Visível	Vis
Padrão Interno	PI
Limite de Detecção	LD
Limite de Quantificação	LQ
Desvio Padrão Relativo	RSD
Organização Internacional do Vinho	OIV

Índice de figuras e quadros

	página
Figura 1.1 – Aspeto da folha e do cacho da casta Touriga Nacional.	7
Figura 1.2 – Produção e utilização das estacas de porta enxertos de videira em Portugal.	10
Figura 1.3 – Principais fases do processo de produção de enxertos prontos. .	11
Figura 1.4 – Representação esquemática do processo de preparação de enxerto pronto.	12
Figura 1.5 – Preparação das estacas de porta-enxerto.	12
Figura 1.6 – Acondicionamento dos garfos em câmara com temperatura controlada.	13
Figura 1.7 – Preparação de garfos.	13
Figura 1.8 – Aspeto da união do garfo com a estaca do porta-enxerto.	14
Figura 1.9 – Processo de parafinagem dos enxertos.	14
Figura 1.10 – Colocação dos enxertos para estratificação.	15
Figura 1.11 – Acondicionamento dos enxertos em câmara com temperatura controlada.	15
Figura 1.12 – Processo de triagem dos enxertos prontos.	15
Figura 1.13 – Instalação dos enxertos prontos no viveiro.	16
Figura 1.14 – Aspeto de um viveiro.	16
Figura 1.15 – Aspeto dos enxertos prontos para comercialização.	17
Figura 1.16 – Enraizamento de enxertos prontos em estufa.	17
Figura 1.17 – Planta em vaso e respetiva instalação na vinha.....	17
Figura 1.18 – Aspeto da plantação da vinha.....	18
Figura 1.19 – Ciclo do ácido chiquímico.	24
Figura 1.20 – Esquema representativo da via biossintética das classes de flavonoides.	25
Figura 2.1 – Esquema do ensaio.	27
Figura 2.2 – Cromatogramas dos extratos de tecidos da enxertia de combinações da casta Touriga Nacional com o porta-enxerto 110 R (a – TN 112/110 R; b – TN 21/110 R) e de padrões (c), com deteção a 280 nm (1) e a	

325 nm/454 nm (2).	32
Figura 3.1 – Fórmulas de estrutura dos ácidos benzóico (a) e do ácido gálgico (b).	33
Figura 3.2 – Variação da concentração média de ácido gálgico ao longo do ciclo de enxertia.	39
Figura 3.3 – Variação da concentração de ácido gálgico ao longo do ciclo de enxertia nas secções a, e, b.	39
Figura 3.4 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido ferúlico (b).	41
Figura 3.5 – Variação da concentração média de ácido ferúlico ao longo do ciclo de enxertia.	42
Figura 3.6 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido clorogénico (b).	43
Figura 3.7 – Variação da concentração média de ácido clorogénico ao longo do ciclo de enxertia.....	44
Figura 3.8 – Variação da concentração do ácido clorogénico ao longo do ciclo de enxertia, nas secções a, e, b.....	45
Figura 3.9 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido cafeíco (b).	46
Figura 3.10 – Variação da concentração média de ácido cafeíco ao longo do ciclo de enxertia.	47
Figura 3.11 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido sinápico (b).	48
Figura 3.12 – Variação da concentração média de ácido sinápico ao longo do ciclo de enxertia.	49
Figura 3.13 – Variação da concentração do ácido sinápico ao longo do ciclo de enxertia, para as combinações A e B.	50
Figura 3.14 – Variação da concentração de ácido sinápico ao longo do ciclo de enxertia, nas secções a, b, e.	51
Figura 3.15 – Esquema representativo da estrutura geral dos flavonóides.	51
Figura 3.16 –Estrutura dos flavanóis (+)–catequina (a) e (-)–epicatequina (b).	53
Figura 3.17 – Variação da concentração média de catequina ao longo do ciclo de enxertia.	54
Figura 3.18 – Variação da concentração de catequina ao longo do ciclo de enxertia para as combinações A e B.	54
Figura 3.19 – Variação da concentração de catequina ao longo do ciclo de	

enxertia nas secções a, e, b.	55
Figura 3.20 – Variação da concentração média de epicatequina ao longo do ciclo de enxertia.	56
Figura 3.21 – Variação da concentração de epicatequina ao longo do ciclo de enxertia para as combinações A e B.	57
Quadro II.1 – Descrição do material vegetal utilizado no ensaio.	28
Quadro II.2 – Padrões utilizados.	30
Quadro II.3 – Parâmetros relativos à linearidade das curvas de calibração, limiares analíticos e sensibilidade.	33
Quadro III.1 – Concentração média de ácido gálico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.	36
Quadro III.2 – Concentração média de ácido ferúlico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.	41
Quadro III.3 – Concentração média de ácido clorogénico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.	43
Quadro III.4 – Concentração média de ácido cafeíco (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.	46
Quadro III.5 – Concentração média de ácido sinápico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.	48
Quadro III.6 – Concentração média de catequina (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.	54
Quadro III.7 – Concentração média de epicatequina (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.....	56
Quadro A.1 – Tempos de retenção relativos dos compostos fenólicos identificados nas combinações A e B , para as três secções e para todo o ciclo de enxertia.	72
Quadro A.2 – Áreas dos picos cromatográficos correspondente à combinação A (TN 112/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.	73
Quadro A.3 – Áreas dos picos cromatográficos correspondente à combinação B (TN 21/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.	75
Quadro A.4 – Áreas corrigidas (sem aberrantes) dos picos cromatográficos correspondente à combinação A (TN 112/110 R), para as três secções e	

para os três estágios do ciclo de enxertia.	76
Quadro A.5 – Áreas corrigidas (sem aberrantes) dos picos cromatográficos correspondente à combinação B (TN 21/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.	77
Quadro A.6 – Concentrações dos compostos fenólicos (mg/L) correspondentes à combinação A (TN 112/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.	78
Quadro A.7 – Concentrações dos compostos fenólicos (mg/L) correspondentes à combinação B (TN 21/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.	79

Índice

	página
Introdução	1
I. Revisão Bibliográfica	2
I.1. A filoxera e o seu ataque às videiras europeias.....	2
I.2. A enxertia e a razão da sua disseminação na viticultura	3
I.3. O processo de enxertia	4
I.4. A importância da escolha do porta-enxerto	4
I.5. A casta Touriga Nacional	6
I.5.1. Características da casta Touriga Nacional e sua condução no campo	7
I.5.2. Importância Enológica da casta Touriga Nacional	8
I.6. O processo de produção de enxertos-prontos e a importância do enxerto pronto	9
I.6.1. Diferentes estádios do ciclo de enxertia em bancada	11
I.6.2. Vantagens e inconvenientes do enxerto-pronto	18
I.7. O sucesso no processo de enxertia	19
I.7.1. A compatibilidade da enxertia	19
I.8. Os compostos fenólicos e a sua importância na compatibilidade da enxertia	21
I.8.1. Os compostos fenólicos das plantas. Origem biossintética	23
I.8.2. O papel dos compostos fenólicos na deteção da compatibilidade da enxertia	25
II. Material e métodos.....	27
II.1. Delineamento Experimental	27
II.2. Material vegetal	28
II.3. Métodos analíticos	29
II.3.2. Extração dos compostos fenólicos	30
II.3.3. Preparação das amostras	30
II.3.4. Análise dos compostos por cromatografia líquida de alta resolução	32
II.4. Tratamento de dados	34
II.5. Análise estatística	35

III. Resultados e discussão.....	36
III.1. Ácido gálgico	36
III.1.1. Efeito da combinação na concentração de ácido gálgico	37
III.1.2. Efeito da secção na concentração de ácido gálgico	38
III.1.3. Efeito do tempo na concentração de ácido gálgico	38
III.2. Ácidos hidroxicinâmicos	40
III.2.1. Ácido ferúlico	40
III.2.1.1.Efeito da combinação na concentração de ácido ferúlico	41
III.2.1.2. Efeito da secção na concentração de ácido ferúlico	41
III.2.1.3. Efeito do tempo na concentração de ácido ferúlico	42
III.2.2. Ácido clorogénico	43
III.2.2.1. Efeito da combinação na concentração de ácido clorogénico ...	43
III.2.2.2. Efeito da secção na concentração de ácido clorogénico	44
III.2.2.3. Efeito do tempo na concentração de ácido clorogénico	44
III.2.3. Ácido cafeíco	45
III.2.3.1. Efeito da combinação na concentração de ácido cafeíco	46
III.2.3.2. Efeito da secção na concentração de ácido cafeíco	47
III.2.3.3. Efeito do tempo na concentração de ácido cafeíco	47
III.2.4. Ácido sinápico	48
III.2.4.1. Efeito da combinação na concentração de ácido sinápico.....	48
III.2.4.2. Efeito da secção na concentração de ácido sinápico	49
III.2.4.3. Efeito do tempo na concentração de ácido sinápico	49
III.3. Flavanóis (catequina e epicatequina)	52
III.3.1. Catequina	53
III.3.1.1. Efeito da combinação na concentração da catequina	54
III.3.1.2. Efeito da secção na concentração da catequina	54
III.3.1.3. Efeito do tempo na concentração da catequina	54
III.3.2. Epicatequina	56
III.3.2.1. Efeito da combinação na concentração da epicatequina	56
III.3.2.2. Efeito da secção na concentração da epicatequina	56
III.3.2.3. Efeito do tempo na concentração da epicatequina	56
IV. Conclusões	58
Bibliografia	60
Anexos	75

Introdução

O mundo atual requer celeridade e ao mesmo tempo eficácia. Na viticultura não é diferente; instalar uma vinha e colocá-la a produzir o mais rapidamente e com o menor custo possível é a ambição de qualquer produtor. No entanto, a concretização deste objetivo só é possível através de avanços resultantes de investigação técnico-científica e da sua aplicação no campo. A enxertia e, mais concretamente, a utilização de combinações casta/porta–enxerto compatíveis enquadra-se neste plano.

Plantas enxertadas de alta qualidade são produzidas por viveiristas profissionais ao invés de viticultores. A qualidade global, bem como o preço dos enxertos–prontos produzidos por grandes produtores comerciais, é muito maior e mais competitivo do que os produzidos por pequenos produtores ou associações de agricultores. Mas para isso, o viticultor deve confiar nos produtos que os viveiristas colocam no mercado.

Nesta perspetiva, o viveirista deverá agir no sentido de prever a compatibilidade antes de o viticultor proceder à instalação definitiva da vinha. Poderá para isso recorrer a técnicos especializados que possam fazer análises prévias que permitam a predição da compatibilidade de enxertia. À medida que o conhecimento avança e são comprovadas melhores práticas ao nível da enxertia, cabe aos técnicos especializados a sensibilização do legislador para que sejam exigidas estas análises no processo de certificação de enxertos–prontos de videira.

A necessidade de otimizar e reduzir os custos inerentes à instalação de uma vinha e a diminuição de custos relacionados com a substituição de plantas que morrem, bem como a escassez de mão-de-obra, incentivam a procura de enxertos–prontos certificados, cujo processo de certificação englobe maior número de itens.

O trabalho já realizado no Instituto Nacional Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) – Estação Vitivinícola Nacional (Dois Portos), no âmbito do projeto *Vitis Grafting*¹, trabalho que estudou a compatibilidade da enxertia em videira, em que as múltiplas variáveis foram investigadas, conduziu à conceção das condições do presente trabalho, que pretende dar um contributo para o conhecimento e desenvolvimento do processo de enxertia.

No presente trabalho foi estudada a composição fenólica de tecidos da zona de enxertia. Os resultados obtidos para as combinações de dois clones da casta Touriga Nacional (clones TN 21 e TN 112) com o porta-enxerto 110 R, , revelaram que o ácido

1

PTDC/AGR–PRO/118081/2010 - “Uso da sequenciação em larga escala de pequenos RNAs e análise transcriptómica no estudo da incompatibilidade da enxertia em videira (*Vitis* spp.)”; sob coordenação do INIAV e com a participação do ITQB/UNL e dos Viveiros PLANSEL; financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (2012 e 2015).

cafeico, a catequina e, especialmente, o ácido sinápico poderão ser utilizados para prever o grau de compatibilidade entre casta e o porta-enxerto, de forma a selecionar atempadamente combinações viáveis a utilizar na instalação de futuras vinhas.

I. Revisão Bibliográfica

I.1. A filoxera e o seu ataque às videiras europeias

Até aos anos sessenta do século XIX, no período pré filoxera, as castas europeias (variedades de *Vitis vinifera* L.) desenvolviam-se sobre as suas próprias raízes (vinhas de pé franco). Com a chegada da filoxera à Europa esta prática tornou-se desaconselhada.

A filoxera da vinha, *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch (Hemiptera: *Phylloxeridae*), é uma das pragas da videira mais devastadoras em todo o mundo. Após a sua chegada à Europa, proveniente do continente americano, a filoxera causou grandes perdas económicas para o setor vitivinícola (Campbell, 2004). Após algumas observações feitas em campo, constatou-se que a propagação desta praga poderia ser prevenida enxertando as variedades europeias em porta-enxertos tolerantes, e durante vários anos a técnica foi aplicada com esse objetivo. No entanto, nas últimas décadas, o aparecimento de biótipos de filoxera mais agressivos tem sido relatado (Granett *et al.*, 1985; Forneck *et al.*, 2001).

Um dos sintomas do ataque é o aparecimento de galhas nas folhas, outro é o aparecimento de nódulos nas raízes, uma vez que são os locais que funcionam como hospedeiros naturais do parasita. As “galhas” que se formam nas raízes primárias, que se caracterizam pelo inchaço, originam posteriormente a “nodosidade”. As raízes da *Vitis vinifera* são órgãos metabolicamente ativos que permitem que a planta obtenha os nutrientes e a água necessários ao seu desenvolvimento. Contudo, a infestação pela filoxera é capaz de destruir o sistema radicular das videiras provocando a sua morte (Granett *et al.*, 2001).

Assim, a compreensão da interação entre filoxera e a raiz da videira tem suscitado grande interesse por parte das comunidades técnica e científica. O número de estudos que se dedicaram à investigação da resposta fisiológica e molecular da videira à penetração da filoxera é escasso e foca-se principalmente nos metabolitos primários do tecido radicular. Nestes estudos, encontraram-se concentrações superiores de mono- e dissacáridos (Zotov, 1954; Schaefer, 1985), de aminas (Zotov, 1954; Kellow, 2004), de aminoácidos (Kellow, 2004) e de amidas (Kellow, 2000) em comparação com as encontradas em raízes não infestadas. Alguns estudos sobre a interação entre filoxera e as raízes da videira descreveram mudanças anatómicas na raiz durante a formação das nodosidades (Niklowitz, 1954; Hofmann, 1957; Forneck *et al.*, 2002) e também investigaram a composição química

das nodosidades formadas - ácidos fenólicos, açúcares (Denisova, 1965; Sobetskiy e Derzhavina, 1973).

Trabalhos em que foi avaliada a resposta metabólica das folhas de videira a uma infestação de filoxera relataram uma redução na proporção de ácido linoleico/ácido linolénico (Tucker *et al.*, 2007), bem como no teor de clorofila, mas um aumento nos pigmentos relacionados ao ciclo xantofílico (Blanchfield *et al.*, 2006).

Os compostos voláteis são uma classe importante de metabolitos que se sabe estarem envolvidos na resposta de muitas espécies de plantas a vários tipos de stresse abiótico (Hirai *et al.* 2004; Seki *et al.*, 2007) e biótico, particularmente a pragas como a filoxera, a que está associada uma maior formação de metabolitos voláteis nas folhas (Dicke *et al.*, 1990; Hofmann *et al.*, 2004; Batovska *et al.*, 2008) e nas raízes (Rasmann *et al.*, 2005; Lawo *et al.*, 2011).

O estudo anatómico da formação da nodosidade de Niklowitz (1954), foi a primeira abordagem. As novas tecnologias têm permitido obter um conhecimento mais detalhado da interação entre filoxera e a videira.

Como as espécies americanas de videira eram resistentes a esta praga, desde essa altura até hoje utilizam-se como porta-enxertos. Com esta prática foi possível obter resistência a pragas e doenças que têm como reservatório o solo, bem como maior tolerância a algumas condições desfavoráveis (como a elevada salinidade, a secura e o excesso de acidez do solo); assim consegue-se assegurar a propagação, um maior rendimento e o controlo do vigor da videira (Lee *et al.*, 2010).

A propagação da videira pode ser feita de forma sexuada ou por via vegetativa. Tendo em conta os resultados e o conhecimento, a propagação de videiras é maioritariamente realizada por via vegetativa (enraizamento de varas atempadas e enxertia) e mais raramente por mergulhia (Magalhães, 2015).

I.2. A enxertia e a razão da sua disseminação na viticultura

A enxertia é uma técnica muito utilizada na fruticultura e na viticultura. É praticada com o objetivo de explorar as potencialidades das culturas, consoante os fatores bióticos e abióticos (principalmente condições do solo onde estão implantadas) a que estão sujeitas, de modo a controlar o vigor da vegetação (Legros, 1993; Lee *et al.*, 2010). Em viticultura, a enxertia foi iniciada na Europa, com a finalidade de reintroduzir o cultivo da vinha em solos infetados pela filoxera (Cookson *et al.*, 2013).

No entanto, o processo de enxertia envolve uma componente que nos últimos anos tem vindo a ser um fator importante a considerar: a compatibilidade entre o porta-enxerto e

o garfo (*Vitis vinifera* L.). Com efeito, a falta de compatibilidade provoca prejuízos elevados a nível económico, já que normalmente só se manifesta de forma visível após a instalação da vinha.

I.3. O processo de enxertia

A enxertia foi desenvolvida na tentativa de conseguir a união perfeita entre o garfo e o porta-enxerto, de modo a criar uma nova planta cuja parte radicular corresponde ao porta-enxerto e a parte aérea ao garfo. Significa que a enxertia não é mais que a união de dois biontes diferentes, em que um é o porta-enxerto (videira americana) e o outro é o garfo (casta de videira europeia) (Magalhães, 2015). O seu sucesso depende das condições climáticas, que variam de ano para ano, do bom estado de conservação dos materiais e da habilidade do enxertador (Magalhães, 2015). Assume ainda considerável relevância, a escolha do porta-enxerto para a casta pretendida, processo que deve ser cuidadoso para evitar problemas após instalação da vinha.

I.4. A importância da escolha do porta-enxerto

A escolha do porta-enxerto é uma das decisões mais importantes do viticultor, porque essa escolha refletir-se-á na qualidade da vinha. De modo a obter vinhas isentas de vírus e outros problemas sanitários, atualmente os viticultores recorrem sobretudo a porta-enxertos certificados. A escolha do porta-enxerto de videira tem como critérios: resistência a pragas e doenças; resistência à secura, características do solo (calcários, ácidos, salinos); casta a ser cultivada; sistema de condução (Miele *et al.*, 2009). Além destas características, sabe-se que os porta-enxertos, em geral, influenciam o vigor e o desenvolvimento da variedade de *Vitis vinifera*. No entanto, são poucos os estudos sobre a interação porta-enxerto/garfo (Santarosa *et al.*, 2016).

Os porta-enxertos dividem-se em dois grupos: variedades puras e variedades híbridas. Os híbridos são provenientes de cruzamentos inter-específicos.

No grupo das variedades puras encontra-se a *Rupestris du Lot*. Trata-se de um porta-enxerto muito vigoroso e com um ciclo vegetativo longo. É adequado para castas que produzem vinhos de consumo corrente e para produção de uvas de mesa tardias. Contudo, é impróprio para castas sensíveis ao desavinho. Por outro lado, devido ao seu grande vigor, por vezes passado um ano da sua plantação, tem um diâmetro excessivo para ser enxertado. A resposta ao enraizamento, enxertia em bancada e no local é considerada boa. Suporta até 14% de calcário ativo. O *Rupestris du Lot* é mais sensível à filoxera e aos nemátodos do que outras *Vitis* americanas. A utilização deste porta-enxerto é aconselhada

para solos considerados pobres, pedregosos, soltos ou compactos, secos à superfície, mas frescos em profundidade (Duarte e Dias, 1987; Magalhães, 2015).

No grupo das variedades híbridas, os cruzamentos inter-específicos mais utilizados, nomeadamente em Portugal, são os seguintes:

- *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*, cujos produtos comerciais mais representativos são o 1103 P, 99 R, 110 R e 140 Ru (Duarte e Dias, 1987; Magalhães, 2015);
- *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*, cujos produtos comerciais são o 161-49 C e SO4.

As características que os diferenciam são as seguintes (Magalhães, 2015).

- **Richter 110 (110 R)** - é muito vigoroso, com elevada resistência à secura, por isso não muito aconselhado na instalação de vinhas com rega. Tolerar terrenos com calcário ativo até 17% e confere muito boa maturação às castas enxertadas. No entanto, em solos muito férteis pode atrasar a maturação das uvas. Muitas vezes a resposta ao enraizamento é fraca devido ao atempamento deficiente. Em relação à enxertia no local, os resultados são bons, mas na enxertia em bancada ocorrem muitas vezes problemas devido à falta de enraizamento. A sua resistência à salinidade do solo é nula e revela resistência insuficiente aos nemátodos. Em relação à humidade e à filoxera é considerado mais sensível do que outros porta-enxertos. Apresenta boa adaptação a solos pobres e secos.

- **Richter 99 (99 R)** - é muito vigoroso, tem elevada resistência à secura, suportando solos com calcário ativo até 17% e tem muito boa compatibilidade para a enxertia de castas portuguesas, para além de uma boa capacidade de enraizamento. Apresenta boa resistência aos nemátodos. Adapta-se bem a solos pedregosos ou não, mesmo que sejam compactos. Pertence ao grupo dos porta-enxertos mais recomendados.

- **Paulsen 1103 (1103 P)** - é muito vigoroso, com resistência muito elevada à secura, embora tolere muito bem a humidade no solo. Suporta calcário ativo até 17% e outros sais no solo. Este porta-enxerto, devido à elevada amplitude de tolerância hídrica, aumentou a sua importância nos últimos anos, sendo a segunda variedade mais procurada.

- **Ruggeri 140 (140 Ru)** - é muito vigoroso, apresenta resistência elevada à secura mas grande sensibilidade à humidade no solo. Suporta os terrenos calcários (25% de calcário ativo). A sua utilização não é aconselhada em solos muito férteis ou em castas com tendência ao desavinho. A resposta ao enraizamento é fraca mas a resposta à enxertia no local apresenta bons resultados. Apresenta boa resistência à seca e boa adaptação a solos secos. Por outro lado, está contra-indicado para solos muito húmidos.

- **Sélection Oppenheim n.º4 (SO 4)** - é vigoroso, com boa tolerância à humidade no solo. É bastante sensível à seca e suporta bem a humidade. Adapta-se bem na instalação de vinhas de uva de mesa e quando se recorre à rega, suportando calcário ativo até 20%. Deve de ser plantado em solos férteis e frescos. Apresenta um desenvolvimento inicial muito rápido e um grande vigor, por isso favorece a frutificação e antecipa a maturação das uvas. É considerado um bom produtor de madeira e a resposta ao enraizamento é boa. A resposta à enxertia no local é boa. Em relação à enxertia em bancada o resultado é apenas satisfatório. Possui boa adaptação a solos ácidos. Possui resistência aos nemátodos do género *Meloidogynae* e nenhuma resistência à salinidade. É bastante sensível à seca e suporta bem a humidade.

161-49C - De vigor considerado fraco a médio, proporciona uma frutificação regular da casta e um avanço na maturação da uva. É um bom produtor de madeira, a resposta ao enraizamento é média e à enxertia no local é boa. É muito resistente ao calcário, suportando até 25% de calcário ativo sem sintomas de clorose. Também suporta bem a humidade e a sua resistência à secura é razoável. Está indicado apenas para os solos calcários e argilosos, permeáveis e não para os solos argilosos compactos.

I.5. A casta Touriga Nacional

Portugal é o país com maior número de castas por área territorial ocupada por vinha, havendo mesmo quem afirme que é o país com maior número de castas (Magalhães, 2015). Nos últimos anos, fruto da evolução tecnológica da viticultura e da enologia nacionais, os vinhos portugueses ganharam qualidade e notoriedade. Esta notoriedade fez despertar o interesse por algumas castas portuguesas. A casta nacional que mais interesse tem despertado aos enólogos de outros países é a Touriga Nacional - **TN** (Magalhães, 2015).

No território nacional, a Touriga Nacional é considerada uma casta nobre e por isso, muito apreciada. É uma casta que se encontra disseminada pela quase totalidade das regiões vitícolas portuguesas - Douro, Beiras, Alentejo, Lisboa, Bairrada, Península de Setúbal, Tejo, Algarve e Açores.

Uma das suas principais características é possuir uma película espessa, rica em matéria corante (polifenóis totais e antocianinas), o que permite obter vinhos tintos com cor intensa. Outra é a abundância dos aromas primários, imagem de marca da casta (Eiras-Dias *et al.*, 2011; Magalhães, 2015).

Trata-se de uma casta que não é muito produtiva, no entanto, é capaz de originar vinhos equilibrados, com boas graduações alcoólicas e com excelente capacidade de envelhecimento (Magalhães, 2015).

Atendendo à sua representatividade e características, foi escolhida para avaliação da compatibilidade da enxertia no âmbito do presente trabalho.

I.5.1. Características da casta Touriga Nacional e sua condução no campo

A Touriga Nacional é uma casta fértil, embora possa ser pouco produtiva (1kg/cepa). A baixa produtividade deve-se à sua sensibilidade às condições ambientais (Eiras-Dias *et al.*, 2011; Magalhães, 2015).



Figura 1.1 – Aspeto da folha e do cacho da casta Touriga Nacional.

Fonte: Magalhães (2015)

As videiras de Touriga Nacional apresentam a extremidade do ramo jovem aberta, com orla carmim e média densidade de pelos prostrados. A folha jovem é verde com tons acobreados (Figura 1.1), página inferior com média densidade de pelos prostrados. Possui uma flor hermafrodita. O pânpano surge estriado de vermelho, com gomos ligeiramente avermelhados. A folha adulta é pequena, pentagonal, com cinco lóbulos; limbo verde médio, plano e bolhoso; na página inferior tem média densidade de pelos prostrados e de pelos eretos; dentes curtos e retilíneos (Eiras-Dias *et al.*, 2011).

O cacho desta casta é pequeno, cilindro-cónico, medianamente compacto e apresenta um pedúnculo de comprimento médio e pé muito lenhificado (Figura 1.1). O bago é ligeiramente achatado e com uma tonalidade negro-azul; a película tem espessura considerável; a polpa é mole. O bago é pequeno, de película rija e difícil de destacar e tem bastantes grainhas (Magalhães, 2015).

O comportamento em campo traduz-se num abrolhamento precoce, possuindo uma floração também precoce. O pintor surge na média das restantes castas tintas e o período

de maturação é considerado também médio quando comparado com outras castas tintas (Magalhães, 2015).

No que respeita à condução, tratando-se de uma casta muito vigorosa, de porte retombante, exige vinhas aramadas, com o segundo arame próximo do arame de formação (a cerca de 25 cm), para evitar a queda dos pâmpanos. Durante a floração, a zona dos cachos deve permanecer bem arejada, com os lançamentos bem levantados e não se deve despontar, para evitar uma emissão acentuada de netas. É uma casta com tendência para fazer abrolhar muitos gomos secundários e latentes, que adensam a copa, por vezes perigosamente, na zona da frutificação. Face a estas características, é recomendada a utilização de porta-enxertos de baixo ou médio vigor (Magalhães, 2015).

O sistema de condução deve ser em monoplano vertical ascendente com poda curta em cordão Royat (unilateral ou bilateral). Os talões não devem ser demasiado curtos, devendo ter pelo menos três gomos, incluindo o da coroa.

A Touriga Nacional não apresenta especial sensibilidade ao conjunto das doenças fúngicas mais habituais (míldio, oídio e podridão cinzenta) ou a pragas (cigarrinha e traça). Contudo, a forma de condução e o vigor podem condicionar a sensibilidade a estas doenças. Verifica-se, no entanto, uma nítida sensibilidade à escoriose (Magalhães, 2015).

No tocante ao rendimento, resultado da seleção clonal feita nos últimos anos, a Touriga Nacional revela hoje uma produtividade aceitável, situada entre as cinco e as oito toneladas por hectare. Embora revele boa adaptação à grande diversidade de solos, os terrenos férteis e frescos no verão são-lhe pouco favoráveis no que respeita à qualidade. Pelo contrário, é satisfatoriamente rústica, suportando alguma carência hídrica no Verão, exceto nos solos delgados onde pode sofrer perdas de folhas intensa e precoce, que podem comprometer o processo de maturação, como consequência da diminuição brusca da taxa fotossintética (Magalhães, 2015).

I.5.2. Importância Enológica

A casta Touriga Nacional dá origem a vinhos de cor retinta, com tonalidades violáceas quando novos. O aroma é intenso, reconhecendo-se o aroma a frutos pretos maduros, com travo silvestre (amoras silvestres). No entanto, predomina o aroma a violeta, atribuído principalmente à presença de β -ionona (Magalhães, 2015).

O grau alcoólico provável é geralmente alto e a acidez total do mosto e o pH são equilibrados.

Na boca apresenta-se encorpado, persistente, robusto, taninoso e muito frutado quando jovem. Possui elevado potencial para envelhecimento prolongado, durante o qual adquire uma elegância, um aroma e sabor aveludado inconfundíveis (Magalhães, 2015).

I.6. O processo de produção de enxertos-prontos e a importância do enxerto pronto

O condicionalismo climático para o sucesso da enxertia em videira no campo acentua-se nas regiões onde o clima é menos favorável, como é o caso das zonas que se situam no limite da latitude Norte (paralelo 40) para a cultura da vinha. Os países vitícolas do sul da Europa estabeleceram, durante muitos anos, as suas vinhas com resultados satisfatórios, plantando os bacelos de espécies americanas sobre as quais realizavam as enxertias no campo (montão), no ano seguinte à plantação. Os países vitícolas mais a norte desenvolveram técnicas de enxertia em bancada, para ultrapassar as taxas de insucesso das enxertias no campo. Foi a partir da realização da enxertia em bancada, desenvolvida e testada na Alemanha e no norte de França, que a técnica de produção de enxertos prontos se disseminou por todo o mundo vitícola, inclusive em Portugal (Magalhães, 2015).

O enxerto pronto é uma planta que resulta da enxertia realizada em bancada, recorrendo a máquinas que promovem a união de uma estaca de porta-enxerto (ainda sem raízes) a um garfo, de apenas um olho, da casta pretendida. O processo de estratificação ocorre sob condições ambientais controladas e mais favoráveis.

Esta técnica de produção foi introduzida em Portugal no início dos anos 80 do século passado, essencialmente como uma alternativa à dificuldade que entretanto surgiu de encontrar enxertadores.

Na fase inicial, a adesão dos viticultores portugueses à utilização deste tipo de plantas para estabelecer as novas vinhas foi reduzida, pois existia a ideia de que colocavam em causa o bom desenvolvimento e longevidade da vinha. A diminuição da mão-de-obra veio a determinar que, na atualidade, as novas plantações sejam maioritariamente efetuadas recorrendo a enxertos prontos (Magalhães, 2015).

Os valores apresentados na figura 1.2, publicados pela Viticert - Associação Nacional de Viveiristas Vitícolas Produtores de Material Certificado -, traduzem a evolução verificada na utilização de material certificado na plantação das vinhas em Portugal, no período compreendido 2000 e 2011 (Garrido, 2012).

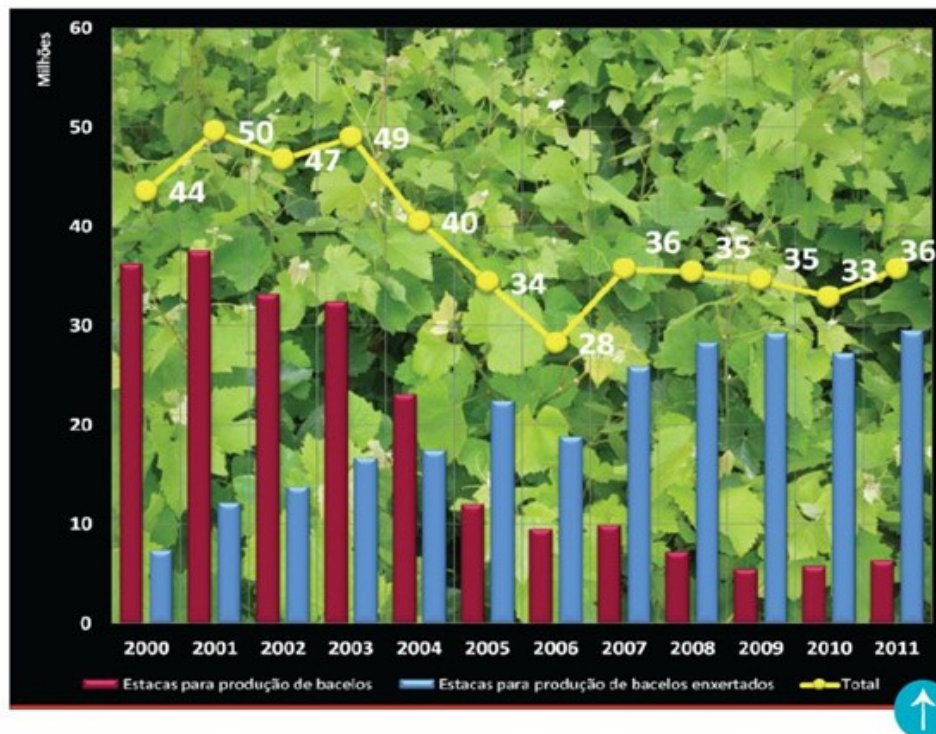


Figura 1.2 – Produção e utilização das estacas de porta enxertos de videira em Portugal.

Fonte: (Vitacert)

I.6.1. Estádios do ciclo de enxertia em bancada

A enxertia de garfo, a mais utilizada em viticultura, é feita na fase de dormência das plantas. Isto é na fase final do Inverno ou no início da Primavera, para que a união dos tecidos e o processo de crescimento ocorram em simultâneo. Durante o outono, as plantas perenes entram em fase de dormência, logo as atividades metabólicas reduzem-se ao mínimo e o crescimento aparentemente cessa. Os sinais ambientais (luz e temperatura) surgem como os principais reguladores do processo de dormência – atividade no ciclo perineal das plantas. As hormonas de sinalização, as alterações na concentração e/ou sensibilidade ao ácido abscísico, auxina e ácido giberélico são importantes nesta fase (Wareing, 1958; Lachaud, 1989; Baba *et al.*, 2011).

A transição entre o crescimento ativo e a dormência envolve alterações celulares, fisiológicas e anatómicas, bem como alterações dos níveis metabólicos. Verifica-se uma ausência de crescimento ao nível das células da extremidade da planta. A diminuição da temperatura marca o início de um ciclo de acumulação de reservas por parte das plantas. Durante a Primavera o crescimento é reativado essencialmente por influência da temperatura. Este crescimento é sustentado pelo catabolismo dos compostos de reserva da planta (Druart *et al.*, 2007, Cookson *et al.*, 2013).

A realização da enxertia em bancada surge como uma forma de obter plantas prontas a instalar em campo, e dessa forma recuperar uma campanha. O ciclo de enxertia em bancada é composto segundo Garrido (2012), pelas fases que se ilustram na figura 1.3:

Operação de Enxertia – No final do inverno, procede-se ao corte nos dois biontes envolvidos no processo, recorrendo a uma máquina. Após o corte procede-se à união de uma estaca de porta-enxerto a um garfo da casta a enxertar. A máquina mais utilizada nesta operação tem geralmente as superfícies de corte em forma de ómega (forma da letra grega);

Calogénese ou estratificação – No início da primavera, realiza-se o processo de ligação entre o garfo e o porta-enxerto, numa câmara com controlo de temperatura, de humidade relativa e de luz;

Enraizamento – Durante a primavera, as plantas enxertadas são colocadas em estufa ou em viveiro, de modo a promover o enraizamento e desenvolvimento vegetativo;

Final do ciclo de crescimento – No final do ciclo vegetativo (novembro-dezembro), realiza-se o arranque das plantas, e procede-se à sua triagem, sendo colocadas no circuito de comercialização apenas as consideradas viáveis e que cumprem as normas de comercialização.

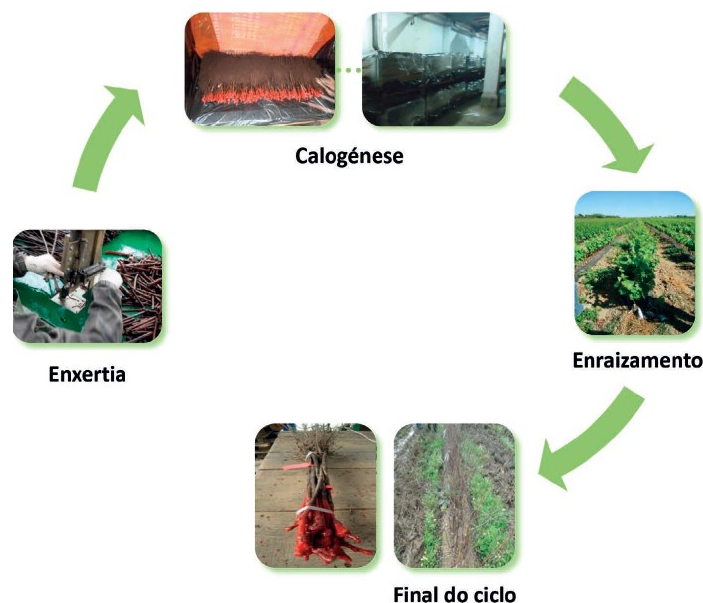


Figura 1.3 – Principais fases do processo de produção de enxertos prontos.

Fonte: Canas *et al.* (2016)

Na figura 1.4 pode visualizar-se, esquematicamente, as operações que integram o processo da produção de enxertos prontos.

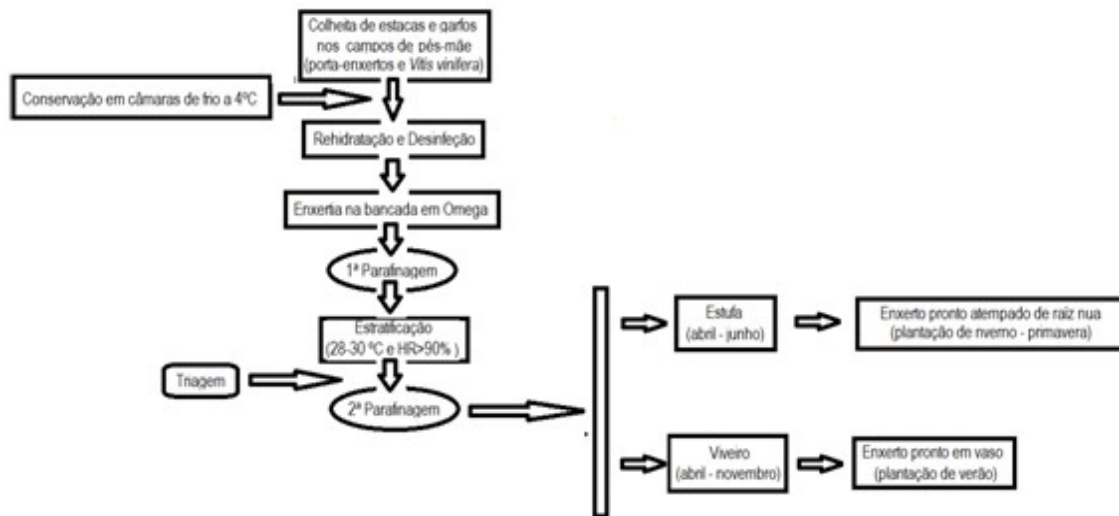


Figura 1.4 – Representação esquemática do processo de produção do enxerto pronto. Adaptado do esquema seguido na Estação Vitivinícola Amândio Galhano

No processo de produção, as estacas de porta enxerto são recolhidas dos campos de pés-mãe durante os meses de inverno, havendo o cuidado de seleccionar apenas estacas bem atempadas. As estacas devem ter diâmetro superior a 6,5 mm e um comprimento de 40 cm. Devem ser previamente desgomadas (Figura 1.5).



Figura 1.5 – Preparação das estacas de porta-enxerto.

Fonte: Garrido (2012).

A conservação das estacas e dos respetivos garfos (recolhidos nos campos de multiplicação de castas), efetua-se em câmara frigorífica a 4 °C (Figura 1.6) até ao momento da realização da enxertia, que normalmente ocorre a partir de meados de fevereiro.



Figura 1.6 – Acondicionamento dos garfos em câmara com temperatura controlada.

Fonte: Garrido (2012).

Antes de se iniciar o processo de enxertia, as estacas e os garfos, cortados com um gomo apenas, devem ser rehidratados e desinfetados. A hidratação ocorre mergulhando-os em água durante 24 horas (Regina, 2002; Cunha *et al.*, 2015). A desinfecção preventiva das estacas pode ser realizada com pulverizações com um fungicida; estas pulverizações são feitas também de forma esporádica durante o enraizamento (Warmund *et al.*, 1986; Keeley *et al.*, 2003; Bordin *et al.*, 2005). Outro processo de desinfecção pode consistir na imersão das estacas numa solução de hipoclorito de sódio com uma concentração de 0,5% durante 15 minutos, seguida de lavagem com água corrente (Cunha *et al.*, 2015). Logo após a secagem, as estacas serão colocados num substrato para estratificação.

A **enxertia** efetua-se utilizando máquinas específicas (Figura 1.7), que fazem o corte e a junção do garfo com a estaca.



Figura 1.7 – Preparação de garfos.

Fonte: Garrido (2012).

O tipo de enxertia mais comum é a enxertia em ómega (Figura 1.8).



Figura 1.8 – Aspeto da união do garfo com a estaca do porta-enxerto.

Seguidamente as estacas são mergulhadas em parafina (Figura 1.9).



Figura 1.9 – Processo de parafinação dos enxertos.

Tradicionalmente, os enxertos são intercalados com camadas de serradura ou algum outro substrato inerte (areia) humedecido e turfa (Regina, 2002), este substrato permite uma boa drenagem. Atualmente, vários viveiristas têm adotado a **estratificação** ou **calogénese** com água, o que facilita a operação de enchimento das caixas e reduz os custos de produção, além de evitar a formação excessiva de raízes durante a fase de estratificação. As caixas são cobertas com plástico (Figura 1.10) e armazenadas em câmara aquecidas a 28-30°C e com humidade relativa elevada (Figura 1.11), onde os enxertos ficam a estratificar até final da calogénese (Regina, 2002).



Figura 1.10 – Colocação dos enxertos para estratificação.

A estratificação ocorre durante cerca de 15 dias, período de tempo necessário para que ocorra a proliferação do tecido de cicatrização e portanto a soldadura entre o garfo e a estaca. Simultaneamente inicia-se o processo de proliferação radicular.



Figura 1.11 – Acondicionamento dos enxertos em câmara com temperatura controlada.

Fonte: Garrido (2012).

À saída da estratificação procede-se à triagem do material (Figura 1.12).



Figura 1.12 – Processo de triagem dos enxertos prontos.

Fonte: Garrido (2012).

As estacas soldadas são novamente colocadas em parafina e instaladas em viveiro (Figura 1.13) para continuarem o processo de **enraizamento** e respetivo desenvolvimento vegetativo.



Figura 1.13. – Instalação dos enxertos prontos no viveiro.

Fonte: Garrido (2012).

Para o efeito são escolhidos terrenos que, entre outras características, apresentem bom teor de matéria orgânica, sejam bem drenados, que aqueçam bem e que não estejam em locais sujeitos geadas tardias. Considera-se que um bom rendimento no viveiro corresponde a uma taxa de vingamento superior a 60% (Magalhães, 2015).

As estacas enxertadas permanecem em viveiro de abril a novembro, período durante o qual devem ser regadas. Convém ainda manter o terreno livre de ervas daninhas e efetuar tratamentos contra as principais doenças e pragas da videira. A obtenção de enxertos prontos mais robustos, em termos de sistema radicular, é favorecida pela realização de uma a duas despontas (técnica que consiste em remover o ápice vegetativo), durante a fase de desenvolvimento vegetativo (Figura 1.14).



Figura 1.14 – Aspeto de um viveiro.

Fonte: Garrido (2012).

Geralmente o arranque em viveiro efetua-se durante os meses de novembro e dezembro (final do ciclo vegetativo); procede-se a uma triagem do material e à poda a dois olhos do lançamento desenvolvido, sendo de novo parafinado.

A conservação dos enxertos prontos é feita no frio até serem expedidos para os viticultores, dando lugar às plantações de Inverno - Primavera. A comercialização efetua-se normalmente em molhos de 25 unidades – Decreto Lei n.º 194/2006 de 27 de Setembro (Figura 1.15), devidamente etiquetados de acordo com a categoria do material. Tratando-se de *material certificado*, a cor da etiqueta é azul. Para material *standard* é laranja.



Figura 1.15 – Aspeto dos enxertos prontos para comercialização.

Fonte: Garrido (2012).

Esta é a forma de produção mais utilizada, todavia, outra via de produção de enxertos prontos ocorre pelo enraizamento em estufa (Figura 1.16), ou seja, à saída da estratificação, as estacas enxertadas são colocadas em vasos de turfa que são dispostos em bancadas de forçagem do enraizamento.



Figura 1.16 – Enraizamento de enxertos prontos em estufa.

Fonte: Garrido (2012).

Esta alternativa permite dispor de videiras enxertadas prontas para plantação em verde, em pleno campo e no final da primavera (Figura 1.17), cerca de mês e meio após a realização da enxertia.



Figura 1.17 – Planta em vaso e respetiva instalação na vinha.

Fonte: Garrido (2012).

I.6.2. Vantagens e inconvenientes do enxerto pronto

Entre as vantagens da utilização do enxerto pronto, para além da já referida, que reside em obviar a falta de enxertadores de campo, o enxerto pronto permite um fácil acesso às castas pretendidas, atualmente já nas diferentes formas clonais, por oposição à seleção massal (Magalhães, 2015) que foi utilizada durante quase todo século XX em Portugal. As vinhas plantadas com enxertos prontos apresentam também maior homogeneidade, facto que resulta da diminuição de falhas, que ocorrem em maior número com a enxertia de campo (Magalhães, 2015).

No que diz respeito às desvantagens face ao processo tradicional, destaca-se o maior custo das plantas e, na fase de instalação da vinha, a necessidade de um maior acompanhamento cultural, devido à necessidade de tratamentos fitossanitários no ano de plantação (Figura 1.18), pois os enxertos prontos são sensíveis às doenças criptogâmicas como o míldio e o oídio (Magalhães, 2015).



Figura I.18 – Aspeto da plantação da vinha.

Fonte: Garrido (2012).

I.7. O sucesso no processo de enxertia

O processo de enxertia envolve um conjunto de fenómenos bioquímicos complexos. Inicia-se com a adesão de duas plantas diferentes, seguida da formação do calo e o consequente estabelecimento de um sistema vascular funcional (Pina e Errea, 2005). Ao nível molecular, a desejada união dos tecidos requer uma reprogramação dos genes de expressão, de tradução de proteínas, e do próprio metabolismo (Pina e Errea, 2005). No entanto, a sequência de eventos subjacentes à união dos tecidos continua por caracterizar. A expressão dos genes sofre alterações durante a união, a qual já foi analisada recorrendo a um fragmento amplificado de uma cadeia de DNA, por uma técnica designada por “Amplified Eragment Length Polymorphism” (AFLP) em momentos temporais diferentes. A análise foi feita três, sete e catorze dias após o momento da enxertia. Este trabalho demonstrou que existem genes relacionados com a produção de ácido indole-3-acético (IAA), com o ciclo celular, com o metabolismo e com a transdução de sinal, que se expressam de modo diferente (Zheng *et al.*, 2010).

I.7.1. A compatibilidade da enxertia

Os parceiros da enxertia pertencem frequentemente à mesma espécie ou género, mas o uso de genótipos diferentes também é comum. A falta de compatibilidade da enxertia surge especialmente nas combinações entre espécies diferentes. Um exemplo deste problema é o que acontece com a videira europeia (*Vitis vinifera*) quando enxertada em porta-enxerto de outra espécie de *Vitis*. Outros casos reportados na literatura dizem respeito à pereira quando é enxertada em marmeleiro, ao damasqueiro enxertado em outras espécies do género *Prunus* (Browning and Watkins, 1991; Errea *et al.*, 2001; Usenik *et al.*, 2006; Tomaz *et al.*, 2009; Cioboratti *et al.*, 2010), à ameixeira (Lapins, 1959; Duquesne, 1969), ao pessegueiro e à amendoeira (Cambra, 1986; Errea *et al.*, 2001).

Para a que a enxertia seja bem sucedida é necessária uma boa união entre o garfo e o porta-enxerto. A maioria dos autores considera que a união da enxertia é bem-sucedida e completa quando as várias conexões do floema e do xilema são funcionais (Moore, 1984; Gersani, 1985; Gebhardt e Goldbach, 1988; Wang e Kollmann, 1996, Schöning and Kollmann, 1997).

A resposta de compatibilidade do enxerto é um mecanismo complexo, que envolve uma gama ampla de interações fisiológicas, bioquímicas e anatómicas (Herrero, 1951; Mosseand e Herrero, 1954; Feucht, 1988; Errea *et al.*, 2001; Pina e Errea, 2008; Goldschmidt, 2014). Um número crescente de estudos tem promovido a observação sistemática das mudanças morfológicas e fisiológicas entre uniões compatíveis e menos

compatíveis de plantas lenhosas (Ermel *et al.*, 1999; Espen *et al.*, 2005). Contudo, a informação disponibilizada é limitada no que respeita às bases bioquímicas da falta de compatibilidade e do mecanismo molecular envolvido (Pina e Errea, 2005, 2008).

Ao longo do tempo foram propostas várias formas de classificar a falta de compatibilidade da enxertia. Herrero (1956), propôs quatro classes de incompatibilidade: a) falha no pegamento do enxerto ou incompatibilidade total; b) falha do enxerto devido à infecção por vírus num dos componentes do enxerto; c) obstrução mecânica da união do enxerto; d) estrutura anormal da união, geralmente associada à acumulação de amido.

Após alguns anos Mosse (1962), propôs uma nova classificação para a falta de compatibilidade e que continua a ser utilizada atualmente. Essa classificação consiste em dividir a falta de compatibilidade da enxertia em dois tipos: i) translocada e ii) localizada. A falta de compatibilidade ‘translocada’ traduz-se no aparecimento de sintomas visíveis durante o desenvolvimento das plantas, como uma interrupção precoce no crescimento, folhas cloróticas evoluindo para avermelhadas, queda prematura das folhas, redução do ritmo de crescimento radicular, redução da translocação de hidratos de carbono na região de união, ocorrendo acumulação na cultivar (Moing, 1987; Moreno, 1993; Zarrouk, 2010). A falta de compatibilidade ‘localizada’ pode ser definida como a ausência de desenvolvimento normal dos tecidos na união de enxertia, resultando em feixes vasculares não completamente lenhificados, que provocam uma interrupção da continuidade vascular e cambial, com consequentes problemas físicos na união do enxerto (Mosse, 1958).

A falta de compatibilidade do tipo “localizado” manifesta-se pela quebra das plantas no ponto de união (Herrero, 1951; Mosse, 1962). Este facto é atribuído às anormalidades anatómicas que ocorrem ao nível dos tecidos vasculares—(Hartmann *et al.*, 1997). O fenómeno de falta de compatibilidade pode levar anos a manifestar-se, e pode ocorrer mesmo após várias campanhas em que tenha havido sucesso no processo de crescimento/produção. Assim, o aparecimento tardio dos sintomas que permitam detetar a falta de compatibilidade da enxertia condiciona os programas de seleção de porta-enxertos.

As plantas resultantes de enxertos pouco compatíveis podem crescer durante vários anos sem apresentarem qualquer sintoma indicativo de falta de compatibilidade (Errea e Felipe 1994, Hartmann *et al.* 1997), dando ideia que existe funcionalidade vascular ao nível da união (Mosse 1962). Alguns estudos anatómicos, ao nível da união, têm mostrado um desenvolvimento anormal da estrutura da união. As anormalidades observadas incluem conexões vasculares deficientes, degeneração do floema ou uma descontinuidade na região da união, provocando fragilidades mecânicas na estrutura e subsequente quebra nesta zona (Herrero, 1951; Buchloh, 1960; Hartmann *et al.*, 1997). Estas manifestações de menor compatibilidade foram observadas pelo menos um ano após o estabelecimento do

enxerto no local de plantação em damasqueiros (Schmid and Feucht, 1981; Simons, 1987; Hartmann *et al.*, 1997).

Estudos realizados na deteção precoce de falta de compatibilidade em damasqueiro indicaram que, embora não tenham sido encontradas diferenças no processo de cicatrização do enxerto, existiam diferenças ao nível da calogénese entre combinações mais compatíveis e menos compatíveis (Errea *et al.*, 1994, Hartmann *et al.*, 1997).

O comportamento das células do calo determina as respostas futuras da união da enxertia. A falta de diferenciação das células em algumas áreas da união do enxerto poderá afetar a atividade dos “novos” xilema e floema, e causar descontinuidades ao nível do câmbio, ocasionando a formação de uma linha parenquimatosa que interrompe as conexões vasculares (Errea *et al.*, 1994, Hartmann *et al.*, 1997). Estas estruturas constituem uma matriz homogénea de pectinas, hidratos de carbono, proteínas e ácidos gordos (Deloire e Hebant, 1982; Macheix *et al.*, 1986; Errea, 1998).

A vasta gama de compostos que existem na zona do calo parece ter um papel mais ativo no reconhecimento celular e na ligação bem sucedida dos tecidos (Miller e Barnett 1993).

Podem ser diferentes as razões a influenciar o sucesso do processo de enxertia: sistema inerente de compatibilidade celular, formação de plasmodesmata, conexões de tecido vascular, presença de reguladores de crescimento e peroxidases. As macromoléculas (proteínas do floema, RNA, hormonas) presentes no floema também podem ser importantes durante a diferenciação vascular no processo de compatibilidade (Pina e Errea, 2005).

Ao nível morfológico, um grau baixo de compatibilidade pode manifestar-se por (Rieger, 2013, Canas *et al.*, 2016): i) diferentes taxas de crescimento e/ou vigor do garfo e do porta-enxerto; ii) amarelecimento nas castas brancas ou vermelhidão das folhas das castas tintas, a que pode suceder uma desfolha precoce; iii) aparecimento de fendas no tecido lenhoso próximo da união do enxerto; iv) intumescência da união do enxerto; v) manifestação de necroses no tronco; vi) crescimento vegetativo reduzido; vii) definhamento e morte da planta enxertada.

Tal como referido atrás, a baixa taxa de compatibilidade da enxertia implica prejuízos elevados, para o viveirista, quando se revela durante o ciclo de enxertia, ou para o viticultor, neste caso mais grave pelo facto de os sintomas surgirem em vinhas já instaladas.

Como se trata de um problema que afeta a viticultura mundial, tem sido uma área que tem despertado interesse em alguns grupos de investigação, que têm procurado compreender as suas causas e pesquisado soluções para detetar esta situação precocemente.

I.8. Os compostos fenólicos e a sua importância na compatibilidade de enxertia

As plantas produzem um grande número de substâncias com significado adaptativo, de forma a sobreviverem nos diferentes nichos ecológicos terrestres. Estas substâncias, genericamente denominadas metabolitos secundários, são fundamentais para o crescimento da planta e estão também envolvidos em todos os processos metabólicos e celulares, como o metabolismo energético, a proteção celular, a regulação génica, a perceção hormonal, a transdução e a reprodução de sinal (Hansch e Mendel, 2009). Por outro lado, desempenham funções de defesa (contra herbívoros, microrganismos, plantas competidoras), de sinalização (atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes), de proteção da radiação ultravioleta (UV) ou como antioxidantes (Daayt e Lattanzio, 2008).

A produção destes compostos pode ser constitutiva-e tem como objetivo proteger as plantas de ataques de uma vasta gama de potenciais atacantes. E pode ainda ser induzida, ocorrendo em resposta a um stresse—(Daayt e Lattanzio, 2008). As defesas induzidas localmente restringem os agentes patogénicos ao local de ataque por um processo designado ‘resposta hipersensitiva’, que causa necrose e morte celular do tecido afetado (Daayt e Lattanzio, 2008). As plantas possuem também a capacidade de enviar moléculas voláteis sinalizadoras a partir do local de ataque, que são translocadas para outras partes da planta, onde vão induzir reações defensivas. O ácido salicílico foi considerado uma das principais moléculas sinalizadoras endógenas que despoleta o sistema defensivo da planta, num mecanismo designado por resistência sistémica adquirida, que confere uma proteção duradoura contra uma vasta gama de microrganismos (Durrant e Dong, 2004). Para além do ácido salicílico, outras moléculas foram também identificadas como aliciadores da produção de polifenóis, como o jasmonato, o metiljasmonato ou o etileno (Zhao *et al.*, 2005).

Por outro lado, sabe-se que, quando as plantas estão sujeitas a stresse ambiental, como elevada intensidade luminosa, temperaturas extremas, seca, salinidade elevada, herbicidas ou deficiências minerais, há uma desregulação entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e o sistema antioxidante, ocorrendo stresse oxidativo (Ahmad *et al.*, 2008). As plantas possuem atividades antioxidantes diferentes, que dependem do conteúdo em moléculas antioxidantes, o que por sua vez é condicionado pelo genótipo e pelas condições ambientais (Lin *et al.*, 2006). Foi sugerido que os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, inibindo ou atenuando os efeitos das ROS (Pietta, 2000).

Os compostos fenólicos integram este grupo de substâncias, existindo evidência sobre o seu papel na compatibilidade da enxertia de algumas espécies.

1.8.1. Os compostos fenólicos das plantas. Origem biossintética

Os compostos fenólicos são um grupo de metabolitos secundários que se caracterizam pela presença de, pelo menos, um anel fenólico ou seja, contêm um grupo hidroxilo associado a um anel aromático. São dos metabolitos secundários mais abundantes nas plantas, sendo que cerca de 2% do carbono fotossintetizado é convertido em flavonóides e compostos relacionados (Manach *et al.*, 2006; Daayt e Lattanzio, 2008). São um grupo diversificado, tanto ao nível de estruturas químicas como ao nível de funções biológicas. As suas vias metabólicas são complexas e, em muitos casos, existem múltiplos destinos metabólicos (Robards e Antolovich, 1997).

Os compostos fenólicos nas plantas incluem diferentes classes e estruturas pertencentes ao ciclo do fenilpropanóide, resultante do ciclo do ácido chiquímico. As plantas utilizam os compostos fenólicos nos processos de pigmentação, crescimento, reprodução e resistência a condições adversas (Lattanzio *et al.*, 2006).

A via do ácido chiquímico (Figura 1.19) tem como precursores biossintéticos o fosfoenolpiruvato proveniente da glucólise e a eritrose-4-fosfato proveniente da via das pentoses-fosfato, e vai dar origem ao ácido chiquímico, composto que dá o nome à via.

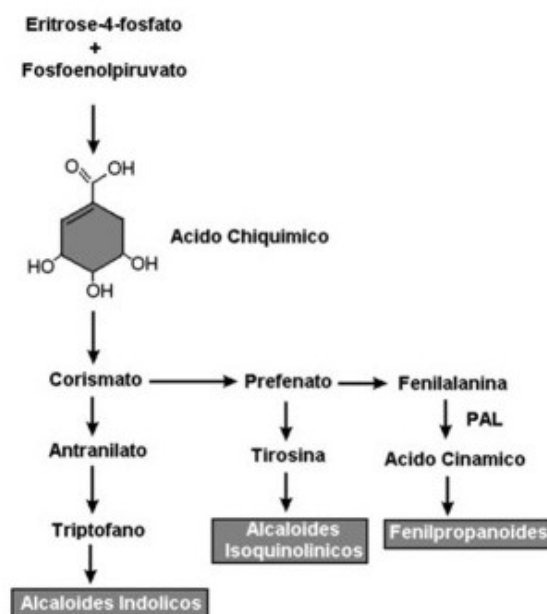


Figura 1.19 – Ciclo do ácido chiquímico.

(Adaptado de Menezes *et al.*, 2008 e Winkel-Shirley, 2002).

Posteriormente, o ácido chiquímico, por fusão com outra molécula de fosfoenolpiruvato, vai dar origem ao ácido corísmico, precursor dos três aminoácidos aromáticos: triptofano; tirosina e fenilalanina. A maioria dos compostos fenólicos nas plantas provém da fenilalanina (Figura 1.20), que após reação de desaminação (perda de molécula

de amoníaco), vai dar origem ao ácido cinâmico. Esta reação é catalisada pela enzima fenilalanina amoníaco liase (PAL), cuja expressão é fortemente regulada e aumenta consideravelmente em resposta a condições de stresse. Adicionalmente, existem genes codificantes para esta enzima, cuja expressão poderá variar consoante o tecido e as condições ambientais em que a planta se encontre. Reações subsequentes à catalisada pela PAL vão dar origem aos diversos grupos de compostos fenólicos, quer por adição de novos grupos funcionais, quer por reações de polimerização (Taiz *et al.*, 2002). As principais enzimas representadas nesta via biossintética são: fenilalanina amoníaco liase (PAL), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H), di-hydroflavonol-4-redutase (DFR), flavonol sintase (FLS), antocianidina sintase (ANS), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina redutase (LAR).

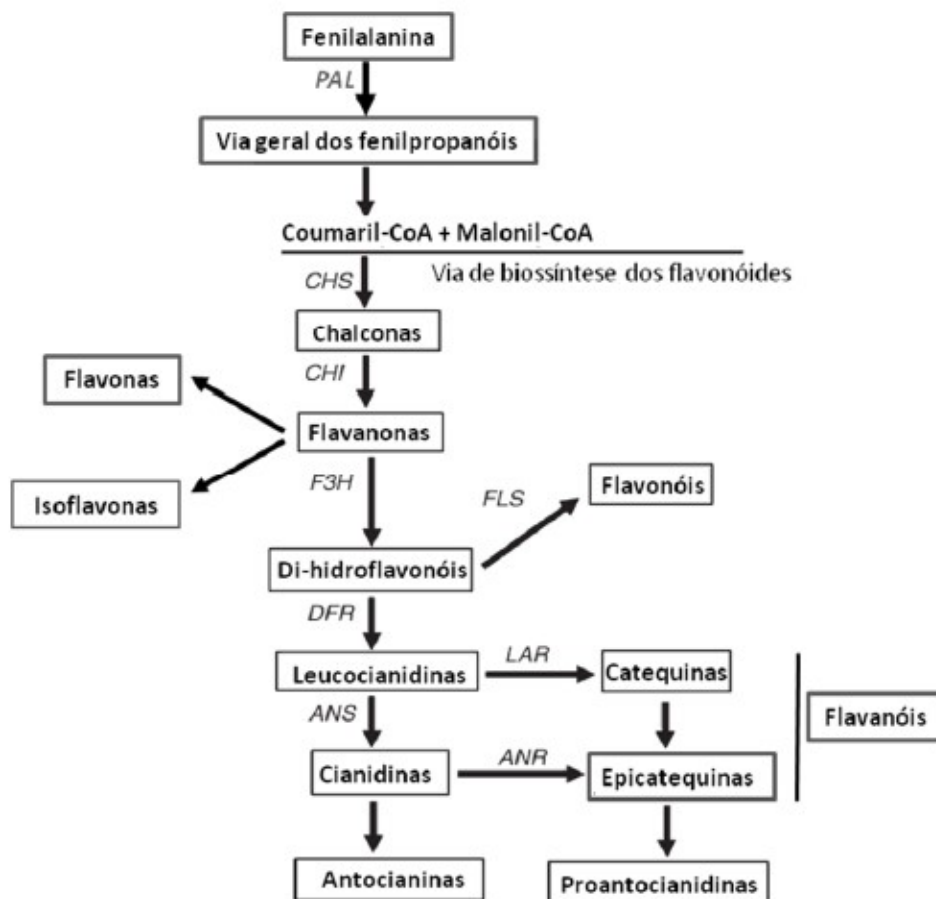


Figura 1.20 – Esquema representativo da via biossintética das classes de flavonóides (Adaptado de Menezes *et al.*, 2008 e Winkel-Shirley, 2002).

Os ácidos fenólicos são compostos simples, incluindo os derivados do ácido cinâmico e os derivados do ácido benzóico. O conteúdo em ácidos hidroxibenzóicos nas plantas é geralmente reduzido, com exceção de alguns frutos (Slatnar *et al.*, 2016).

Os ácidos hidroxicinâmicos, os flavanóis (catequina e epicatequina) e as dihidrocalconas estão presentes nos mecanismos de resposta das plantas às agressões (Mikulič- Petkovšek *et al.*, 2009; Slatnar *et al.*, 2012).

Em geral o nível de compostos fenólicos, observado em tecidos afetados, é maior quando comparado com os níveis destes compostos em tecidos saudáveis (Mikulič- Petkovšek *et al.*, 2011).

1.8.2. O papel dos compostos fenólicos na detecção da compatibilidade da enxertia

A enxertia é interpretada pela planta como uma agressão, e o golpe realizado acaba por funcionar como uma porta de entrada para fungos ou bactérias que podem vir a atacar a planta (Russell *et al.*, 2009). Existem respostas específicas como a acumulação de compostos fenólicos que afetam o sucesso da enxertia (Moore e Walker, 1983; Moore, 1984; Errea *et al.*, 2001; Pina *et al.*, 2009; Nocito *et al.*, 2010; Trinchera *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos mais referidos como associados às questões de compatibilidade são os ácidos benzóicos (ácido gálico), ácidos cinâmicos (ácidos cafeico, clorogénico, ferúlico e sinápico), flavanóis (catequina e epicatequina) (Jay-Allemand *et al.*, 1988). Como resultado da ação de enzimas oxidativas, alguns destes compostos fenólicos podem polimerizar originando taninos (Rhodes e Woollorton, 1978; Fleuriet e Macheix, 1984). No caso de existir falta de compatibilidade da enxertia, podem verificar-se distúrbios metabólicos (Gebhart e Feucht, 1982, Quessada e Macheix, 1984).

Como atualmente não se conhece solução para a falta de compatibilidade em certas combinações variedade/porta-enxerto em geral e de videira em particular, uma tentativa de evitar ou minimizar os prejuízos será detetar esta situação precocemente. Estes testes precoces de compatibilidade podem resultar da análise dos tecidos da zona de enxertia, para selecionar as combinações mais compatíveis.

Têm sido estudados diferentes métodos para a detecção precoce da compatibilidade de enxertia, como as técnicas *in vitro* (Jonald *et al.*, 1990, Errea *et al.*, 2001), os estudos histológicos (Errea *et al.*, 1994; Ermel *et al.*, 1995, 1999), a análise de isoenzimas (Gulen *et al.*, 2002, Fernandez-Garcia *et al.*, 2004) e a análise de compostos fenólicos (Feucht e Treutter, 1991; DeCooman *et al.*, 1996; Errea, 1998; Musacchi *et al.*, 2000; Canas *et al.*, 2015; Assunção *et al.*, 2016).

Analisando os trabalhos publicados sobre a compatibilidade da enxertia em videira (Canas *et al.*, 2015; Assunção *et al.*, 2016), observa-se que os compostos fenólicos intervêm num vasto conjunto de atividades biológicas. Na videira, como em outras plantas, estes compostos desempenham funções de defesa, e a sua produção é desencadeada por situações de stresse (Lattanzio *et al.*, 2008), como ferimentos e infeção por pragas e/ou doenças (Bennett e Wallsgrove, 1994; Wallis e Chen, 2012; Wallis *et al.*, 2013).

São poucos os estudos que relacionam a compatibilidade da enxertia em videira com a composição fenólica; a exceção reside nos trabalhos de Canas *et al.* (2015) e de Assunção *et al.* (2016), desenvolvidos no âmbito do projeto *Vitis Grafting*, em que foi estudada a compatibilidade de dois clones da casta Syrah enxertados em dois porta-enxertos diferentes (110 R e SO4). A primeira abordagem (Canas *et al.*, 2015) consistiu em desenvolver e validar uma metodologia analítica para a identificação e a quantificação de compostos fenólicos em tecidos de enxertos de videira. Subsequentemente, este método revelou-se válido para distinguir combinações casta/porta-enxerto com diferentes níveis de compatibilidade (Assunção *et al.*, 2016). Os resultados destes trabalhos apresentaram-se promissores, o que levou a ponderar a hipótese de continuar o estudo, de modo a obter um conhecimento mais aprofundado sobre o comportamento destes compostos em outras combinações casta/porta-enxerto e encontrar maior sustentação para os propor como marcadores da compatibilidade da enxertia. Perspectiva-se portanto a análise química baseada na detecção de compostos fenólicos e na determinação das suas concentrações nos tecidos da zona de enxertia como forma de prever o grau de compatibilidade entre variedades de *Vitis vinifera* e os porta-enxertos usados. Neste contexto foi delineado e realizado o presente trabalho.

II. Material e métodos

II.1. Delineamento Experimental

Com objetivo de estudar o papel dos compostos fenólicos no metabolismo do sistema casta/porta-enxerto e de averiguar a possibilidade da sua utilização como marcadores químicos da compatibilidade de enxertia, o trabalho baseou-se no delineamento experimental apresentado na figura 2.1.

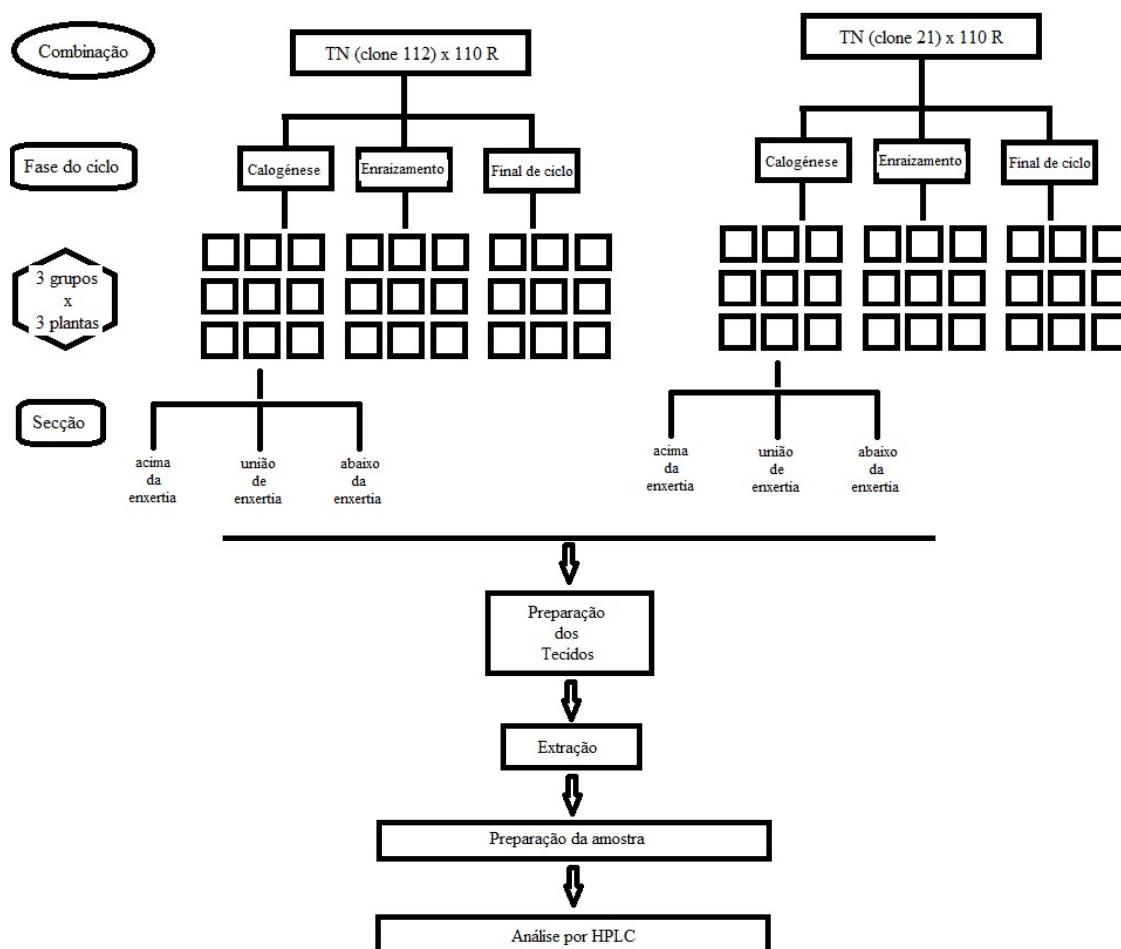


Figura 2.1 - Esquema do ensaio.

Trata-se, portanto, de um ensaio baseado num fatorial com três fatores: combinação casta/porta-enxerto (com dois níveis); fase do ciclo de enxertia (tempo, com três níveis) e secção (com três níveis). Foi assim obtido um total de 108 amostras para análise: 2 combinações x 3 fases do ciclo de enxertia x 3 grupos de plantas x 3 secções x 2 extrações.

II.2. Material vegetal

Foram utilizadas duas combinações entre garfos de *Vitis vinífera* L., de dois clones da casta Touriga Nacional e um clone do porta-enxerto Ritcher 110 (110 R), descritos no quadro II.1.

Os clones da casta Touriga Nacional foram selecionados por serem propensos a diferentes níveis de stresse biótico e abiótico na fase de enraizamento de plantas enxertadas, de acordo com os resultados do obtentor nos ensaios agrónómicos requeridos para a homologação dos clones. Sabe-se que o clone TN 21 apresenta menor afinidade que o clone TN 112 para o porta-enxerto 110 R, o que se traduz numa menor taxa de sucesso no estabelecimento da união de enxertia.

A escolha do porta-enxerto teve como base o que se encontra descrito pelo Institut Français de la Vigne et du Vin, uma vez que a sua utilização se encontra desaconselhada para a casta Syrah, e pretendeu-se confirmar se o comportamento era idêntico para a casta Touriga Nacional.

Quadro II.1 – Identificação do material vegetal utilizado no ensaio

Casta	Garfo (clone <i>Vitis vinífera</i>)	Porta-enxerto	Combinação garfo/porta-enxerto
Touriga Nacional	TN 112 (clone JBP PT)	110 R (clone 2 JBP PT)	A: TN 112/110 R
Touriga Nacional	TN 21 (clone ISA PT)	110 R (clone 2 JBP PT)	B: TN 21/110 R

O material vegetal utilizado foram plantas isentas de vírus provenientes do viveiro PLANSEL, localizado em Montemor o Novo (291 m acima do nível da água do mar, 38°39'N e 8°13'W). Todos os procedimentos relativos ao ciclo de enxertia foram realizados neste viveiro.

Em abril de 2012, as plantas foram enxertadas utilizando uma máquina de enxertia com corte tipo “ómega” e os enxertos foram cobertos com parafina a 75-80°C de modo a realizar a selagem da zona da enxertia e facilitar a ligação entre o porta-enxerto e o garfo. Após este processo, as plantas foram colocadas numa câmara, no escuro, durante três semanas, estando sujeitas a uma temperatura de 30°C e com uma humidade relativa de 80% - 90% de modo a induzir a calogénese.

Em maio de 2012, as plantas enxertadas foram transferidas para o campo, de modo a promover o enraizamento, onde permaneceram até final do ciclo de enxertia, em fevereiro de 2013.

As plantas amostradas foram transportadas, no mesmo dia, para o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) – Dois Portos e mantidas em câmara frigorífica a 4 °C. No dia seguinte, os tecidos vegetais de cada combinação foram preparados segundo o método descrito por Canas *et al.* (2015). As plantas foram cortadas doze centímetros abaixo da extremidade superior, agrupadas (três grupos de três plantas cada), identificadas utilizando um código, e foram guardadas em câmara a -80°C.

Aquando da preparação dos tecidos vegetais foi removida a parafina e recolheram-se três secções com um centímetro de comprimento cada. Uma secção de um centímetro foi cortada a um centímetro acima da enxertia - **a** (correspondente ao garfo), outra 1 cm abaixo da enxertia – **b** (correspondente ao porta-enxerto) e uma terceira secção correspondente à zona de enxertia - **e**.

Seguidamente procedeu-se ao corte longitudinal de cada secção e foram eliminados a casca e o córtex. Os tecidos restantes (xilema, floema e câmbio) foram imediatamente congelados com azoto líquido para quebrar as paredes celulares e depois moídos em almofariz, para posterior análise. Para cada secção, os tecidos de cada conjunto de três plantas foram misturados, determinada a sua massa, colocados em folha de alumínio, congelados em azoto líquido e conservados a -80°C até ao momento da extração.

II.3. Métodos analíticos

II.3.1. Padrões e solventes

O ácido gálgico monohidratado, o ácido clorogénico, o ácido cafeíco, o ácido ferúlico, o ácido sinápico, a (-)-epicatequina, a escopoletina e o protocatequaldeído foram adquiridos à Fluka (Buchs, Suíça); a (+)-catequina foi adquirida à Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Todos estes compostos foram utilizados como padrões (Quadro II.2), sem purificação adicional.

Quadro II.2 – Padrões utilizados

Composto	Número CAS	Pureza (%)
Ácido gálico	149–91–7	>99
Ácido clorogénico	327–97-9	>99
Ácido cafeico	331–39-5	>99
Ácido ferúlico	537–98-4	>99
Ácido sinápico	530–59-6	>99
(-)-Epicatequina	490–46-0	>99
(+)-Catequina	154–23-4	>98
Escopoletina	92–61-5	>98
Protocatequaldeído	139–85-5	>99

Os padrões foram preparados com metanol “gradient grade” (Merck, Darmstad, Alemanha) com pureza superior a 98%.

Os solventes utilizados na extração das amostras e na análise cromatográfica possuíam grau de pureza equivalente. Após a preparação, os solventes foram filtrados com uma membrana de porosidade de 45 µm (Millipore, E.U.A.) e desgaseificados num banho de ultrassons.

II.3.2. Extração dos compostos fenólicos

De acordo com o método otimizado no laboratório (Canas *et al.*, 2015), 100 mg dos tecidos de cada secção foi extraído com 20 mL de uma mistura de acetona/água 80/20 % (V/V) contendo 0,4 % de Triton X-100 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), durante oito dias, numa câmara a 4 °C, em duplicado.

II.3.3. Preparação das amostras

Após a extração, uma alíquota de cada extrato (9 mL) foi evaporada até à secura, num evaporador rotativo (Buchi R 200, Flawil, Suíça) a 40 °C. O resíduo foi posteriormente dissolvido em 1,5 mL de metanol. As amostras foram centrifugadas (Corvall RC–5B, Dupont Instruments, E.U.A.) a 6315 g durante quinze minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e filtrado usando uma membrana de porosidade de 0,45 µm (Titan, Scientific Rasources Gloucester, Reino Unido) para análise posterior.

A cada amostra foi atribuído um código de cinco caracteres: duas letras, sendo uma maiúscula e outra minúscula, dois números árabes e um número romano. A letra maiúscula é relativa à combinação garfo/porta-enxerto; a letra **A** corresponde à combinação TN 112/110 R e a letra **B** corresponde à combinação TN 21/ 110 R. O primeiro número árabe

indica o estágio do ciclo de enxertia e toma três valores diferentes; o número **1** corresponde à calogénese, o número **2** corresponde ao enraizamento e o número **3** corresponde ao final de ciclo. A letra minúscula é relativa à secção da enxertia; a letra “**a**” corresponde à secção acima da enxertia, a “**b**” corresponde à secção abaixo da enxertia e a “**e**” corresponde à secção da zona de enxertia. O segundo número árabe diz respeito ao grupo de plantas e pode tomar os valores 1,2 ou 3. A numeração romana é respeitante à extração, realizada em duplicado (I e II). Exemplo: “A1a1_I” é a amostra respeitante à combinação A, na calogénese, acima da enxertia, grupo 1, extração I (Quadros A.2 – A.7).

II.3.4. Análise dos compostos por cromatografia líquida de alta resolução

Os compostos fenólicos - ácidos gálico, ferúlico, clorogénico, cafeico, sinápico, (+)-catequina e (-)-epicatequina - foram quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), segundo o método desenvolvido e validado por Canas *et al.* (2015).

Equipamento

Recorreu-se a um equipamento de HPLC Lachrom Merck Hitachi (Darmstadt, Alemanha), constituído por: bomba quaternária L-7100; forno para colunas L-7350; detetor UV-Vis L-7400; injetor automático L-7250 com sistema de termostatização. O controlo, aquisição e tratamento de dados cromatográficos foi efetuado através do software HSM D-7000 (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Condições cromatográficas

As condições cromatográficas aplicadas foram as seguintes: temperatura de 40°C; fluxo de 1mL/min; volume de injeção de 20 µL; solventes usados para eluição: A - água/ácido fórmico 98:2 % (v/v) e B - metanol/água/ácido fórmico 70:28:2 % (v/v/v).

Na deteção dos ácidos gálico e ferúlico, da (+)-catequina e da (-)-epicatequina utilizou-se um detetor de ultravioleta-visível a 280 nm, atendendo aos seus comprimentos de onda de absorção máxima. Os ácidos clorogénico, cafeico e sinápico foram detetados por fluorescência, a 325 nm (excitação)/454 nm (emissão), pelo facto da fluorescência permitir melhor separação e resolução dos picos destes compostos.

Os extratos dos tecidos de enxertia foram adicionados com os padrões internos: PI1– protocatequaldeído (20 mg/L) e PI2 – escopoletina (2 mg/L) e injetados (20 µL).

Identificação dos picos cromatográficos

A identificação dos picos cromatográficos dos compostos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos das amostras por comparação com os dos respetivos padrões (Quadro A.1, em Anexo).

O espectro UV-Vis (200 – 400 nm) e a pureza cromatográfica dos picos foram obtidos utilizando um HPLC Waters equipado com um detetor de fotodíodos (Waters 1996), nas mesmas condições cromatográficas e os dados foram tratados com o software (Waters, Milford, E.U.A.). Na Figura 2.2 são apresentados alguns exemplos de cromatogramas obtidos e a respetiva identificação dos picos.

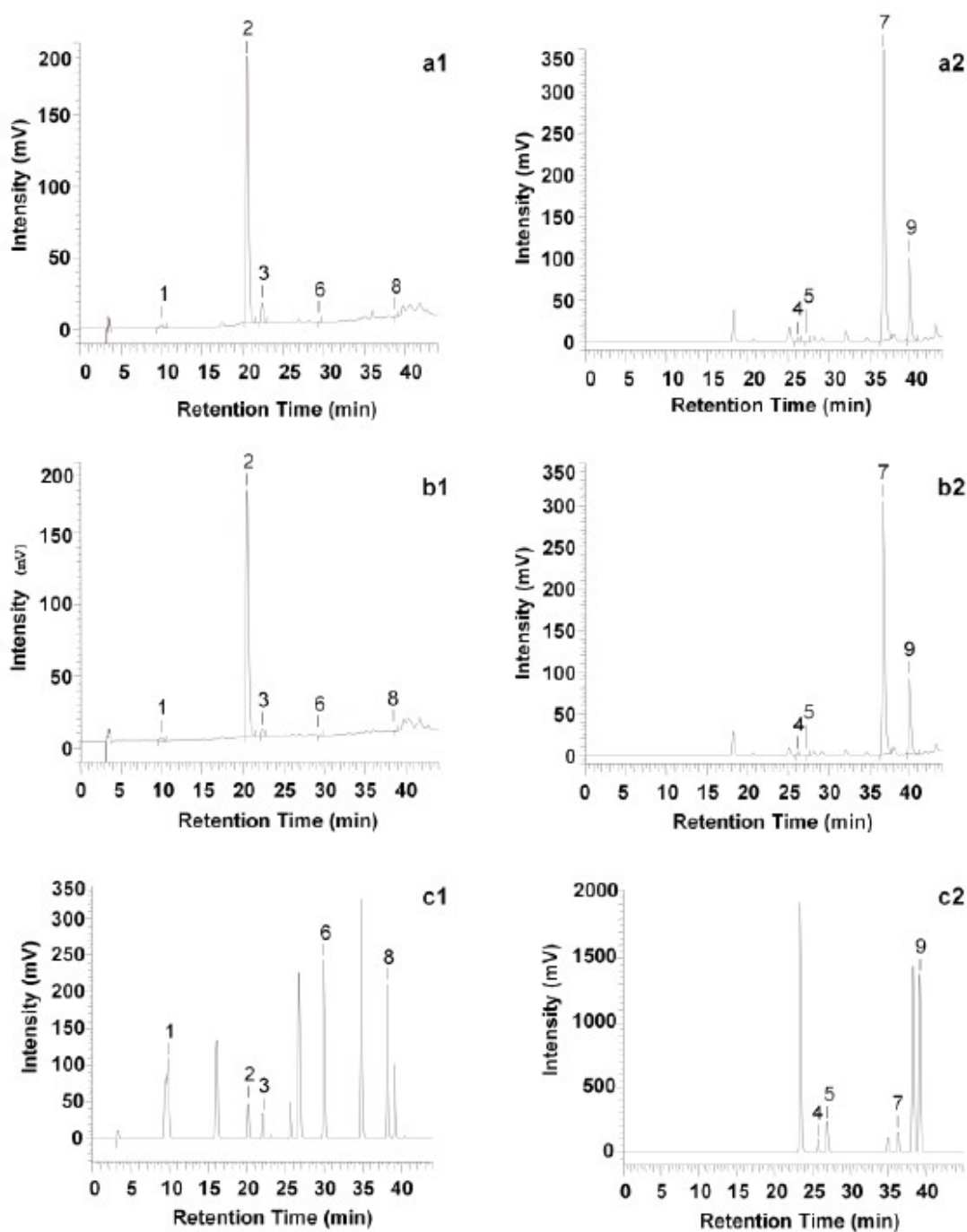


Figura 2.2 – Cromatogramas dos extratos de tecidos da enxertia de combinações da casta Touriga Nacional com o porta-enxerto 110 R (a – TN 112/110 R; b – TN 21/110 R) e de padrões (c), com detecção a 280 nm (1) e a 325 nm/454 nm (2).

Identificação dos picos: 1- Ácido gálico; 2 – Protocatequaldeído (PI1); 3 – (+)-Catequina; 4 – Ácido clorogénico; 5 – Ácido cafeico; 6 – (-)-Epicatequina; 7 – Escopoletina (PI2); 8 – Ácido ferúlico; 9 – Ácido sinápico.

O método cromatográfico aplicado já se encontra validado (Canas *et al.*, 2015), tendo como critérios a linearidade, a sensibilidade, os limiares analíticos (de detecção e de quantificação), a repetibilidade e a especificidade/seletividade (recuperação).

O estudo de linearidade foi baseado na análise em duplicado de seis soluções padrão. Os cálculos foram realizados pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados encontram-se descritos no quadro II.3.

Quadro II.3 – Parâmetros relativos à linearidade das curvas de calibração, limiares analíticos e sensibilidade

	Gama trabalho (mg/L)	b	a	r	Modelo linear	Erro ajustam.	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	S (V.s/mg/L)
Ác. gal	0,25-8	39893,22	-2450,14	0,99984	**	n.s.	0,08	0,25	0,04
Cat	0,99-50	9701,33	-2644,89	0,99987	**	n.s.	0,30	0,99	0,01
Epicat	0,79-15	10074,40	-1325,15	0,99910	**	n.s.	0,24	0,79	0,04
Ác. ferul	0,03-3,5	40923,29	-281,06	0,99998	**	n.s.	0,01	0,03	0,01
Ác. clorog	0,27-5	34191,55	-486,43	0,99993	**	n.s.	0,08	0,27	0,04
Ác. caf	0,11-2	35827,52	-673,96	0,99963	**	n.s.	0,03	0,11	0,03
Ác. sinap	0,87-150	178637,96	-296071	0,99956	**	n.s.	0,26	0,87	0,19

b – declive; a – ordenada na origem, r- coeficiente de correlação, LD – limite de detecção, LQ – limite de quantificação, S- sensibilidade. Adaptado de Canas *et al.* (2015).

Para os sete compostos analisados, a regressão linear foi o modelo que melhor se ajustou para a relação existente entre o pico cromatográfico e a concentração, tendo como base o critério específico constante na norma ISO 8466/1.

Os resultados apresentados no quadro II.3 mostram também que o método é muito sensível para todos os compostos e tem uma capacidade excelente para responder adequadamente, mesmo para diferenças de concentração pequenas como as existentes nos tecidos de enxertos de *Vitis*.

Os valores baixos obtidos para LD e LQ indicam que o método pode ser utilizado para efetuar a análise quantitativa dos compostos fenólicos presentes nos tecidos de enxertos de *Vitis*.

Para além disso, a repetibilidade foi calculada realizando a injeção de dez réplicas de duas diferentes amostras de tecidos de enxerto *Vitis*, em condições de operação contínua num curto intervalo de tempo. O desvio padrão relativo (RSD) varia entre 0,80 e 7,01, provando que a precisão é de 0,01 para os compostos analisados (Canas *et al.*, 2015).

Relativamente à recuperação, tendo em atenção a complexidade da matriz e o elevado número de compostos encontrados nos tecidos de *Vitis*, foram obtidas boas recuperações com valores médios superiores a 88% em todas as concentrações adicionadas para todos os compostos. Além disso, o método apresenta uma resposta linear quanto à relação entre a concentração adicionada e a área do pico para todos os compostos, sendo portanto considerado específico e seletivo (Canas *et al.*, 2015).

II.4. Tratamento de dados

A análise da composição dos tecidos de enxertos de *Vitis* teve como base o método descrito, por se ter verificado ser aplicável para a combinação dos dois clones de Touriga Nacional (TN 21 e TN112) com o porta-enxerto 110 R. Com efeito, os valores de concentração obtidos estão contidos na gama de trabalho e são mais elevados do que os limites de deteção e de quantificação, com exceção do ácido cafeíco (Quadros A.6 e A.7, em Anexo).

Tendo sido realizada a análise química dos tecidos em estudo no âmbito do projeto *Vitis Grafting*, o presente trabalho incidiu no tratamento dos dados cromatográficos e na subsequente análise estatística.

A análise dos dados foi realizada tendo como fator diferenciador de primeira linha a combinação casta/porta-enxerto, em segunda linha a secção da enxertia e em terceira linha a fase do ciclo de enxertia.

Após a identificação de cada um dos ácidos fenólicos e flavanóis, com base no tempo de retenção relativo, avaliou-se a área correspondente a cada um dos picos (Quadros A.2 e A.3, em Anexo).

Pela análise dos coeficientes de variação obtidos para as áreas de cada pico em cada combinação, em cada secção, nos diferentes estádios do ciclo, para cada grupo de plantas e respetivas extrações, verificou-se a existência de alguns valores excessivamente elevados (valor do coeficiente de variação superior a 50%). Nestes casos procedeu-se à verificação dos valores das áreas dos picos, para averiguar a existência de valores aberrantes. Para o efeito, esses valores foram submetidos ao Teste de Grubbs.

O Teste de Grubbs foi desenvolvido para verificar a presença de valores aberrantes em observações respeitantes a amostras (Grubbs, 1950; OIV, 1990). Valores aberrantes podem ser considerados manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, ou apenas resultantes de um erro no cálculo durante a recolha dos dados.

Este teste consiste no cálculo de Z e na comparação com o valor crítico Z_c (baseado na teoria de amostras aleatórias), para decidir se existe ou não uma observação considerada aberrante.

Para o efeito utiliza-se a Equação 1 para calcular o valor de Z (OIV, 1990).

$$Z = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

- x_i - observação da amostra (x_1, x_2, \dots, x_n) considerada suspeita;
- \bar{x} - média;
- s - desvio padrão.

O valor calculado (Z) é comparado com o valor crítico (Z_c) que se encontra tabelado, se $Z > Z_c$ o valor medido é considerado aberrante com uma probabilidade de 95% ou de 99%. Atendendo ao número de observações em comparação, o valor de Z_c considerado foi de 1,87 para um nível de probabilidade de 95%.

Após a aplicação do Teste de Grubbs foram eliminados os valores que se revelaram aberrantes. Assim, foi validada a área dos picos cromatográficos a considerar no cálculo das concentrações (Quadros A.4 e A.5, em Anexo).

Com os valores corrigidos das áreas dos picos e utilizando as curvas de calibração obtidas para os compostos em análise (Quadro II.3), foi possível determinar valores fiáveis de concentração para cada um dos compostos fenólicos em estudo, expressos em mg/L (Quadros A.6 e A.7, em Anexo) para subsequente análise estatística.

II.5. Análise estatística

A análise de variância tripla (ANOVA) foi efetuada de modo a determinar os efeitos da combinação da enxertia, da secção de enxertia e do tempo (estágio do ciclo de enxertia) nos teores de ácidos fenólicos e de flavanóis. O Teste de Fisher, correspondente à diferença significativa mínima (LSD), foi aplicado para comparação das médias aquando da detecção de efeito significativo ($P=95\%$; $p<0,05$), muito significativo ($P=99\%$; $0,05<p<0,01$) ou altamente significativo ($99,9\%$; $p<0,01$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa STATISTICA edição 98 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

III. Resultados e discussão

Os compostos fenólicos analisados nos tecidos vegetais em estudo têm a mesma origem biosintética, tendo como precursor o aminoácido aromático fenilalanina, tal como o referido em II.8.1. Para evidenciar o seu papel na compatibilidade da enxertia, o padrão de comportamento específico de cada composto em função da combinação casta/porta-enxerto, da secção da enxertia e da fase do ciclo de enxertia (tempo) serão descritos separadamente.

III.1. Ácido gálico

O ácido gálico pertence ao grupo dos ácidos hidroxibenzóicos. Difere do ácido benzóico pela presença de três grupos hidroxilo que se encontram nas posições três, quatro e cinco do anel aromático, que não existem no ácido benzóico (Figura 3.1). A fórmula molecular do composto é $C_7H_6O_5$ e é considerado um composto de baixa massa molecular (94,13 g/mol).

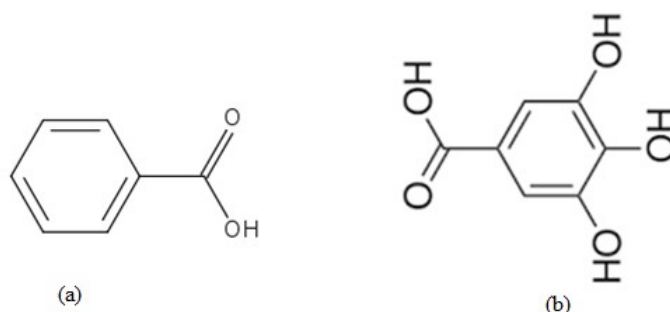


Figura 3.1 – Fórmulas de estrutura dos ácidos benzóico (a) e do ácido gálico (b).

A uva e o vinho constituem uma importante fonte de ácido gálico, um dos principais compostos deste grupo. Adicionalmente, os ácidos benzóicos são também importantes componentes estruturais de moléculas mais complexas, como os taninos hidrolisáveis (Stack, 1997). Será pois natural que este composto se encontre nos tecidos da videira (Ali *et al.*, 2010).

III.1.1. – Efeito da combinação na concentração de ácido gálico

De acordo com os resultados da análise de variância (ANOVA) para o ácido gálgico, avalia-se a significância de cada um dos efeitos e das interações entre eles (Quadro III.1).

Quadro III.1 – Concentração média de ácido gálgico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.

combinação	efeito	ns
	A (112/110 R)	1,02 ± 0,64
	B (21/110 R)	0,95 ± 0,54
secção	efeito	***
	acima da enxertia (a)	0,59 ± 0,23 a
	união enxertia (e)	1,53 ± 0,34 c
	abaixo da enxertia (b)	0,84 ± 0,36 b
interação	tempo x combinação	ns
	tempo x secção	***
	combinação x secção	*
	tempo x combinação x secção	ns

Efeito: *** altamente significativo ($p < 0,01$); * significativo ($p < 0,05$); ns - não significativo.

Letras diferentes indicam diferença altamente significativa, de acordo com o Teste de Fisher.

A concentração de ácido gálgico não varia significativamente em função da combinação casta/porta-enxerto. Na combinação TN 112/110 R a concentração de ácido gálgico ($1,02 \pm 0,64$ mg/L) é ligeiramente mais elevada do que na combinação TN 21/110 R ($0,95 \pm 0,54$ mg/L).

No estudo da compatibilidade da enxertia da casta Syrah com o porta-enxerto 110 R, Assunção *et al.* (2016) constataram que o teor de ácido gálgico era significativamente superior na combinação menos compatível (Sy 383/110 R). Idêntica observação foi reportada pelos autores para a combinação da casta Syrah com o porta-enxerto SO4 mesmo na presença de interações significativas do fator combinação com os fatores secção e tempo. Referiram ainda que este composto funciona como marcador químico da compatibilidade da enxertia nas condições experimentais em que foi realizado o estudo.

A discrepância observada na resposta das duas castas, quando enxertadas no mesmo porta-enxerto, relativamente ao ácido gálgico parece indicar que nenhum dos clones de Touriga Nacional induziu maior acumulação deste composto (resultante do balanço entre os processos de síntese e de degradação) que possa afetar o sucesso da ligação entre os dois biontes. Assim, o grau de compatibilidade entre a casta Touriga Nacional e o porta-enxerto 110 R poderá ser superior ao identificado para a casta Syrah.

Resultados idênticos são descritos na literatura (Usenik *et al.*, 2006), para a composição fenólica de tecidos da zona de enxertia de três cultivares de damasqueiro combinadas com diferentes porta-enxertos.

Por outro lado, os resultados sugerem que não terá sido o genótipo do porta-enxerto a influenciar de forma assinalável a ação do sistema casta/porta-enxerto na fisiologia das plantas enxertadas, ao contrário do verificado com plantas de outras espécies (Sestros *et al.*, 2009, Cioborati *et al.*, 2010).

III.1.2. – Efeito da secção na concentração de ácido gálico

Pela análise dos testes de significância constata-se que as secções da enxertia podem ser diferenciadas com base no teor de ácido gálico, uma vez que a diferença dos teores médios é altamente significativa. Verifica-se que o conteúdo de ácido gálico é bastante superior na união de enxertia, por comparação com as outras secções. Nesta secção, a média do conteúdo ($1,53 \pm 0,34$ mg/L) é praticamente o triplo do valor médio obtido acima da enxertia. Na secção abaixo da enxertia o teor ($0,84 \pm 0,36$ mg/L) é menor que na união da enxertia, mas ainda assim mais elevado que na secção acima ($0,59 \pm 0,23$ mg/L), concordante com o descrito na literatura para tecidos da enxertia de combinações da casta Syrah com os porta-enxertos 110 R e SO4 (Assunção *et al.*, 2016).

O conteúdo mais elevado de ácido gálico na união de enxertia é justificado pela ação antioxidante deste composto (Assunção *et al.*, 2016), contribuindo possivelmente para um estado redutivo das células e possibilitando assim uma maior proteção ao stresse oxidativo decorrente da enxertia e que existe principalmente nesta secção (Irisari *et al.*, 2015; Assunção *et al.*, 2016).

III.1.3. – Efeito do tempo na concentração de ácido gálico

De acordo com os resultados da ANOVA (Figura 3.2), o conteúdo de ácido gálico sofre uma variação altamente significativa do decurso do ciclo de enxertia. Na calogénese ($1,30 \pm 0,63$) é superior ao da fase de enraizamento ($1,10 \pm 0,63$); na fase de final de ciclo a concentração de ácido gálico é ainda menor ($0,56 \pm 0,18$). A diminuição progressiva do conteúdo de ácido gálico está de acordo com o descrito na literatura para a enxertia da casta Syrah em porta-enxertos 110 R e SO4 (Assunção *et al.*, 2016). É pois de salientar a semelhança da resposta das castas Touriga Nacional e Syrah com o porta-enxerto 110 R, evidenciando o porta-enxerto poderá ter sido o fator determinante da concentração de ácido gálico ao longo do ciclo de enxertia.

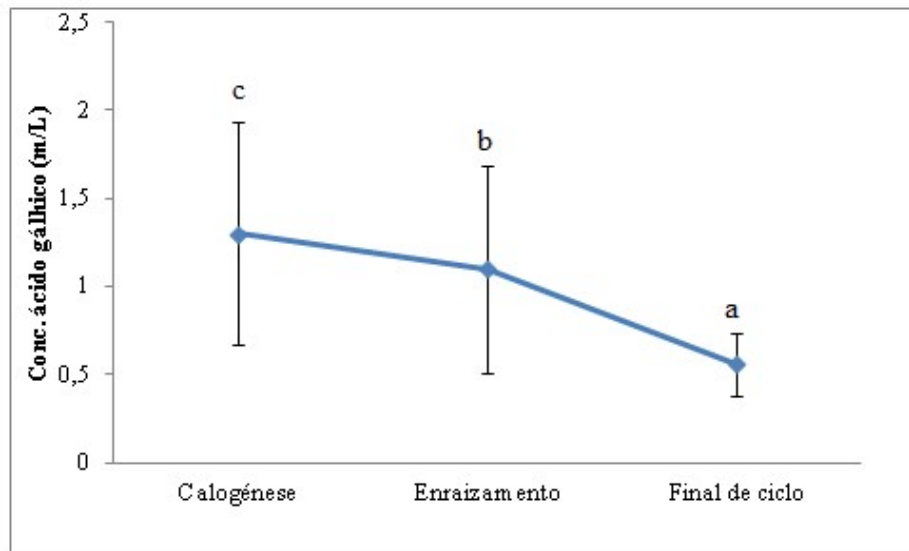


Figura 3.2 – Variação da concentração média de ácido gálico ao longo do ciclo de enxertia.

A evolução da concentração do ácido gálico parece estar de certa forma relacionada com condições de maior stresse oxidativo associado à primeira fase do ciclo de enxertia (Irisari *et al.*, 2015) e vai ao encontro das observações feitas em outro estudo em *Eucalyptus* (De Cooman *et al.*, 1996).

Como a interação dos fatores tempo x secção é altamente significativa, a evolução do teor deste composto será analisada mais detalhadamente nas diferentes secções ao longo do ciclo de enxertia (Figura 3.3).

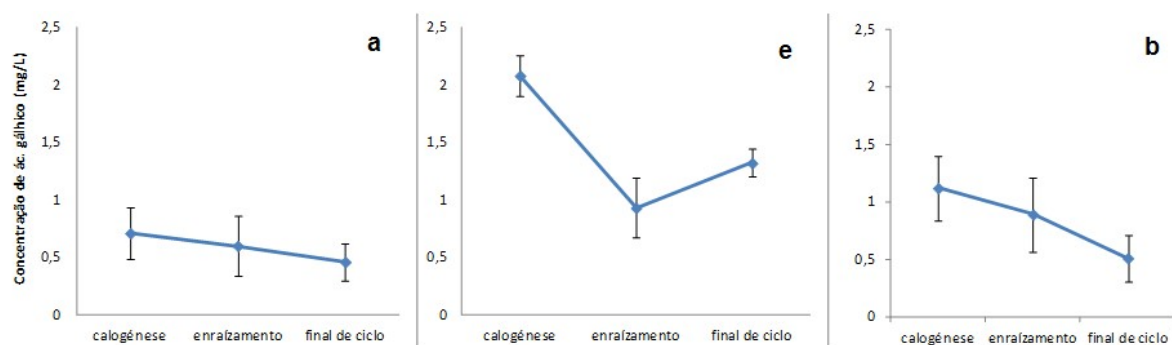


Figura 3.3 – Variação da concentração de ácido gálico ao longo do ciclo de enxertia nas secções a, e, b.

Verifica-se que, durante o ciclo de enxertia, o conteúdo de ácido gálico apresenta um perfil semelhante para as secções acima da enxertia (a) e abaixo da enxertia (b), a que se associa um máximo no conteúdo deste composto na fase de calogénese em resposta ao elevado stresse oxidativo, tal como referido para a média das concentrações deste composto nas secções (Figura 3.2). Contudo, na união de enxertia (e) tem um perfil

completamente diferente, uma vez que aumenta entre o enraizamento e o final de ciclo. Este comportamento sugere que o ácido gálico poderá estar envolvido em outros mecanismos bioquímicos para além do stresse oxidativo, associados ao processo de enxertia, sobretudo ao nível da união de enxertia.

III.2. Ácidos hidroxicinnâmicos

Nas plantas, os ácidos hidroxicinnâmicos são mais comuns que os ácidos hidroxibenzóicos, raramente se encontram na forma livre, mas ocorrem frequentemente sob a forma de ésteres glucosilados (Slatnar *et al.*, 2012).

Entre os ácidos hidroxicinnâmicos mais abundantes encontram-se o ácido cafeico, presente em muitos frutos e também na uva, o ácido ferúlico, muito abundante em grãos de cereais e na gráinha da uva, e o ácido clorogénico (um éster de ácidos cafeico e quínico), existente em frutos como a uva, muito abundante no café (Manach *et al.*, 2006) e também presente nos tecidos de enxerto de videira (Ali *et al.*, 2010).

III.2.1. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico difere do ácido cinnâmico pela presença de um grupo hidroxilo e de um grupo metóxilo nas posições quatro e cinco do anel aromático, que não existem no ácido cinnâmico (Figura 3.4). A fórmula molecular do composto é $C_{10}H_{10}O_4$, enquadrando-se no grupo dos compostos de massa molecular baixa (194,18 g/mol).

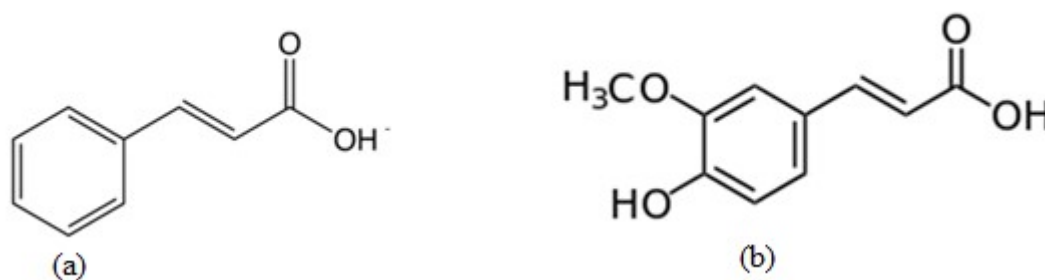


Figura 3.4 – Fórmulas de estrutura do ácido cinnâmico (a) e do ácido ferúlico (b).

A análise de variância permite examinar a influência dos efeitos da combinação e da secção nos conteúdos médios do ácido ferúlico (Quadro III.2).

Quadro III.2 – Concentração média de ácido ferúlico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.

combinação	efeito	ns
	A (112/ 110 R)	0,23 ± 0,17
	B (21/ 110 R)	0,18 ± 0,11
secção	efeito	**
	acima da enxertia (a)	0,16 ± 0,14 a
	união enxertia (e)	0,27 ± 0,08 b
	abaixo da enxertia (b)	0,19 ± 0,05 a
interação	tempo x combinação	ns
	tempo x secção	ns
	combinação x secção	ns
	tempo x combinação x secção	ns

Efeito: ** muito significativo ($0,05 < p < 0,01$); ns - não significativo. Letras diferentes indicam diferença muito significativa, de acordo com o Teste de Fisher.

III.2.1.1. – Efeito da combinação na concentração de ácido ferúlico

Analisando o fator combinação, constata-se que o seu efeito é não significativo, ou seja, o teor de ácido ferúlico em cada uma das combinações não é significativamente diferente. Embora exista elevada variabilidade em torno das médias, que pode resultar da complexidade do delineamento experimental, a inexistência de interações significativas demonstra que o efeito observado para o fator combinação não depende do efeito dos demais fatores em estudo.

Na casta Touriga Nacional observa-se idêntico comportamento ao descrito na literatura para a casta Syrah enxertada no porta-enxerto 110 R, em que o menor teor de ácido ferúlico correspondia à combinação menos compatível. Todavia, a inexistência de concentrações significativamente diferentes nas duas combinações TN/porta-enxerto indicam que este ácido não poderá funcionar como marcador da compatibilidade da enxertia.

III.2.1.2. – Efeito da secção na concentração de ácido ferúlico

Relativamente à secção, a análise de variância mostra que o conteúdo médio de ácido ferúlico é significativamente diferente na união da enxertia quando comparado com o conteúdo das outras duas secções, que não se distinguem entre si.

No estudo com a casta Syrah (Assunção *et al.*, 2016), o ácido ferúlico diferenciava a secção abaixo da enxertia das outras duas. Pois o teor de ácido ferúlico é maior na secção

da união de enxertia, no caso da casta Touriga Nacional, enquanto que na casta Syrah é na secção acima da união de enxertia.

III.2.1.3. – Efeito do tempo na concentração de ácido ferúlico

Segundo os testes de significância, a média dos conteúdos de ácido ferúlico é afetada pelo fator tempo de modo altamente significativo (Figura 3.5): ocorre uma diminuição da calogénese ($0,31 \pm 0,14$) para a fase de enraizamento ($0,12 \pm 0,04$), seguida de um aumento no final de ciclo ($0,20 \pm 0,15$). Esta evolução não se mostra concordante com a literatura (Assunção *et al.*, 2016).

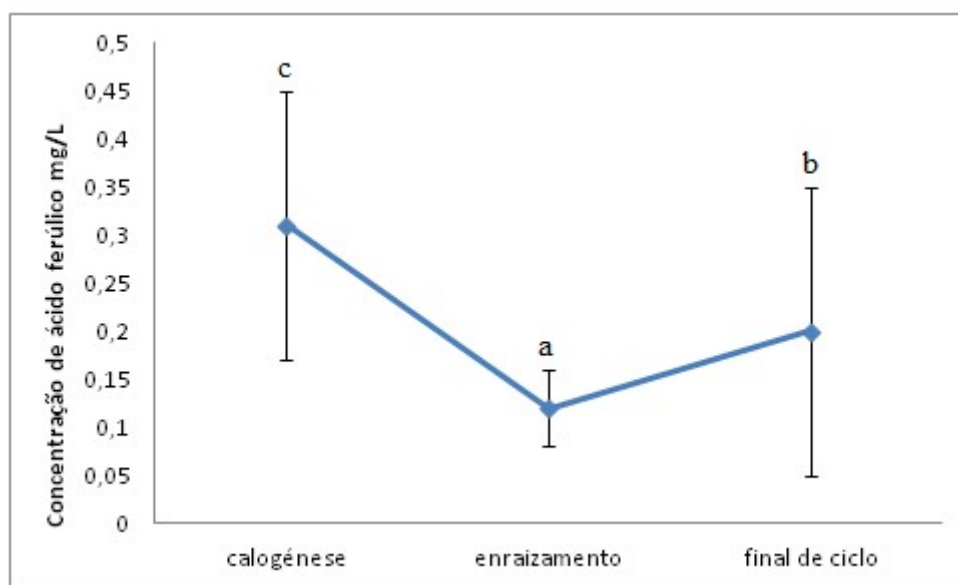


Figura 3.5 – Variação da concentração média de ácido ferúlico ao longo do ciclo de enxertia.

Assunção *et al.* (2016) descrevem, para a casta Syrah, um aumento do teor de ácido ferúlico na fase de enraizamento e uma diminuição na etapa correspondente ao final de ciclo. A diferença de comportamento observado para as duas castas pode ser explicada através da seguinte hipótese: a casta Touriga Nacional poderá ter um metabolismo de lenhificação mais significativo no final de ciclo, quando a planta está a acumular reservas, enquanto na casta Syrah este processo será mais expressivo durante o enraizamento. Tal hipótese é suportada pelo facto do ácido ferúlico e outros ácidos hidroxicinâmicos serem compostos de ligação e estabilizadores no processo de formação da lenhina (Errea *et al.*, 2000; Berjan *et al.*, 2003).

III.2.2. Ácido clorogénico

O ácido clorogénico distingue-se do ácido cinâmico pela presença de dois substituintes no anel aromático, que não existem no ácido cinâmico (Figura 3.6). A fórmula molecular do composto é $C_{16}H_{18}O_9$, de massa molecular 354,31 g/mol.

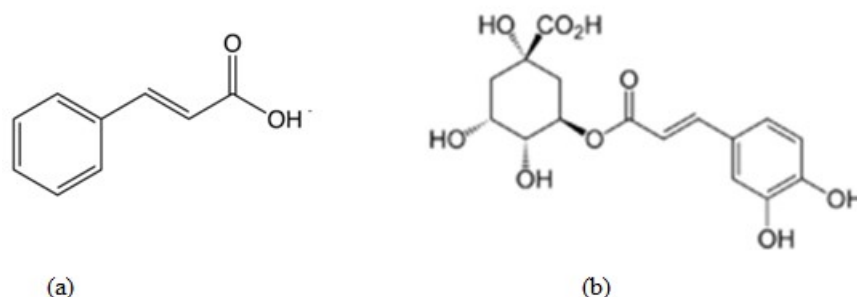


Figura 3.6 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido clorogénico (b).

Através da análise de variância é possível examinar as diferenças entre as médias do conteúdo de ácido clorogénico em função da combinação e da secção (Quadro III.3).

Quadro III.3 – Concentração média de ácido clorogénico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia

combinação	efeito	ns
	A (112/ 110 R)	1,13 ± 0,83
	B (21/ 110 R)	1,23 ± 0,69
secção	efeito	***
	acima da enxertia (a)	0,71 ± 0,34 a
	união enxertia (e)	1,57 ± 0,89 c
	abaixo da enxertia (b)	1,26 ± 0,30 b
interação	tempo x combinação	ns
	tempo x secção	***
	combinação x secção	ns
	tempo x combinação * secção	ns

Efeito: *** altamente significativo ($p < 0,01$); ns - não significativo. Letras diferentes indicam diferença altamente significativa, de acordo com o Teste de Fisher.

III.2.2.1 Efeito da combinação na concentração de ácido clorogénico

No que respeita ao fator combinação, a diferença entre o conteúdo médio do ácido clorogénico não é significativa (Quadro III.3), significando que este ácido não pode servir de marcador químico quando se pretende avaliar a questão da compatibilidade dos enxertos entre os clones da casta Touriga Nacional e o porta-enxerto 110 R. Resultado distinto foi obtido para a casta Syrah com o mesmo porta-enxerto (Assunção *et al.*, 2016), em que a

diferença dos valores médios se mostrou altamente significativa. No entanto, existe um aspeto comum entre os resultados dos dois trabalhos: o conteúdo de ácido clorogénico é mais elevado na combinação em que a compatibilidade é menor. A diferença de comportamento entre as duas castas (existência ou não de diferença significativa entre as duas combinações) pode ser devida ao facto da casta Touriga Nacional ser mais resistente a condições de stresse e daí a menor necessidade da videira em produzir ácido clorogénico, como um composto fenólico de defesa de primeira linha.

III.2.2.2. Efeito secção na concentração de ácido clorogénico

Analisando o efeito da secção na concentração de ácido clorogénico, observa-se que este ácido permite distinguir de forma significativa as três secções, sendo o seu teor mais elevado na união de enxertia, intermédio abaixo da enxertia e menor acima da enxertia. Este facto é explicado na literatura (Hahlbrock e Sheel, 1989, Assunção *et al.*, 2016), onde é referido que a biossíntese do ácido clorogénico pode ser desencadeada pela ferida que é feita para realizar a enxertia, e que o mesmo pode atuar diretamente como composto de defesa ou funcionar como precursor na biossíntese da lenhina, da suberina e de outros compostos fenólicos que integram o sistema de defesa induzida.

III.2.2.3. Efeito tempo na concentração de ácido clorogénico

A evolução do conteúdo de ácido clorogénico em função do tempo, isto é ao longo do ciclo de enxertia, pode ser observada na Figura 3.7.

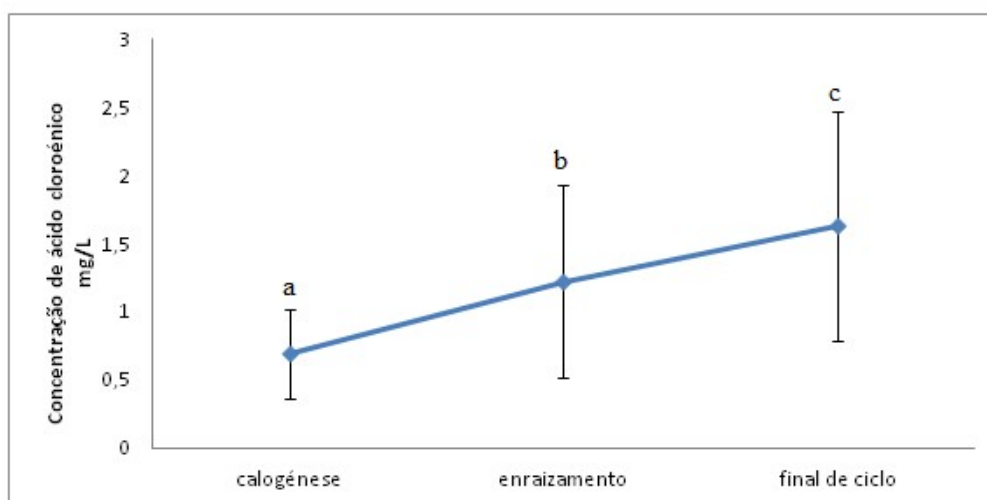


Figura 3.7 – Variação da concentração média de ácido clorogénico ao longo do ciclo de enxertia.

É observado um aumento gradual do conteúdo de ácido clorogénico durante o ciclo de enxertia, o que se mostra concordante com os resultados descritos para a casta Syrah (Assunção *et al.*, 2016). A evolução apresentada parece revelar o envolvimento do ácido clorogénico na biossíntese de lenhina (Errea *et al.*, 2000; Boerjan *et al.*, 2003).

Atendendo a que a interação dos fatores tempo x secção é altamente significativa, importa analisar a evolução do teor deste composto nas diferentes secções ao longo do ciclo de enxertia (Figuras 3.8).

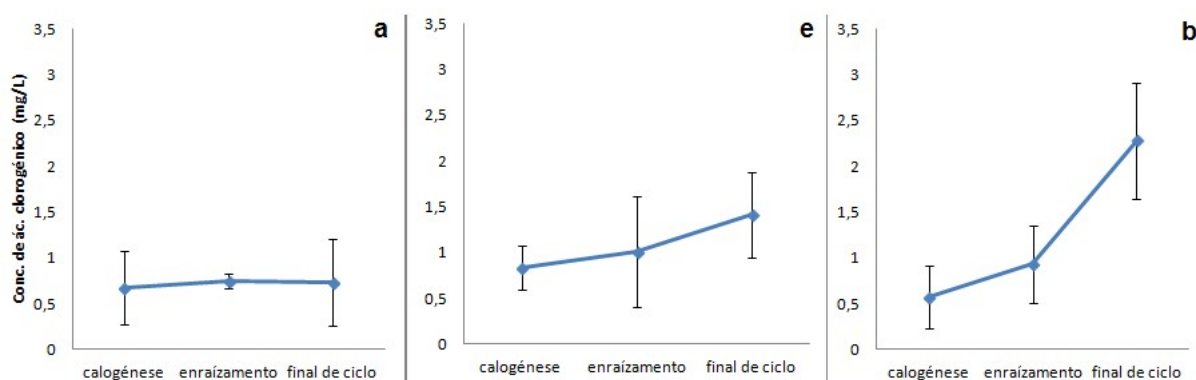


Figura 3.8 – Variação da concentração do ácido clorogénico ao longo do ciclo de enxertia, nas secções a, e, b.

Pela análise dos perfis das três secções ao longo do ciclo de enxertia, verifica-se que a evolução do ácido clorogénico na secção acima da enxertia (a) é diferente da evolução nas outras secções. Na secção acima da enxertia o máximo do conteúdo em ácido clorogénico corresponde à fase de enraizamento, enquanto nas outras duas secções o máximo é atingido no de final de ciclo. O comportamento observado sugere que o papel deste ácido hidroxycinâmico no processo de enxertia está associado ao seu envolvimento na biossíntese da lenhina. Com efeito, os resultados parecem indicar que, nesta casta, a lenhificação ocorre a partir do enraizamento e de forma mais acentuada no final de ciclo, sobretudo na união da enxertia e abaixo da mesma, dando suporte à explicação deduzida a partir do comportamento do ácido ferúlico.

III.2.3. Ácido cafeíco

O ácido cafeíco diferencia-se do ácido cinâmico pela presença de dois grupos hidroxilo que se encontram nas posições três e quatro do anel aromático, que não existem

no ácido cinâmico (Figura 3.9). A fórmula molecular do composto é $C_9H_8O_4$ e a sua massa molecular é 180,16 g/mol.

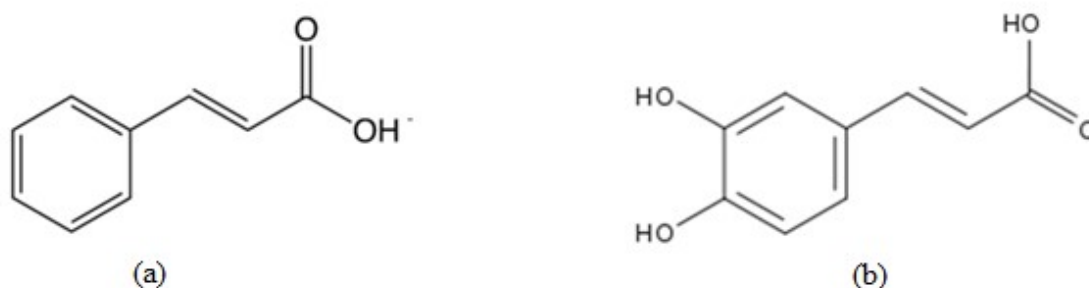


Figura 3.9 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido cafeíco (b).

A partir dos resultados da ANOVA é possível analisar as diferenças entre as médias do conteúdo de ácido cafeíco por efeito dos fatores em estudo (Quadro III.4).

Quadro III.4 – Concentração média de ácido cafeíco (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.

combinação	efeito	*
	A (112/ 110 R)	0,13 ± 0,09 a
	B (21/ 110 R)	0,17 ± 0,14 b
secção	efeito	*
	acima da enxertia (a)	0,11 ± 0,11 a
	união enxertia (e)	0,17 ± 0,10 b
	abaixo da enxertia (b)	0,16 ± 0,04 a,b
interação	tempo x combinação	**
	tempo x secção	ns
	combinação x secção	ns
	tempo x combinação x secção	ns

Efeito: * significativo ($p < 0,05$); ** muito significativo ($0,05 < p < 0,01$); ns - não significativo.

Letras diferentes indicam diferença significativa, de acordo com o Teste de Fisher.

III.2.3.1. Efeito da combinação na concentração de ácido cafeíco

O conteúdo de ácido cafeíco nas duas combinações é significativamente diferente, sendo mais elevado na combinação TN 21/110 R, que é indicada como a menos compatível. Importa salientar que resultado oposto foi obtido por Assunção *et al.* (2016) para a combinação de clones da casta Syrah com o mesmo porta enxerto. Este facto parece indicar que os fenómenos bioquímicos desencadeados como resposta à enxertia e que envolvem o ácido cafeíco são basicamente condicionados pela casta.

III.2.3.2. Efeito da secção na concentração de ácido cafeíco

O conteúdo do ácido cafeíco na secção acima da enxertia e na união de enxertia é significativamente diferente, mas na secção abaixo da enxertia o teor não se diferencia dos teores encontrados nas outras duas secções. O conteúdo é superior na união de enxertia em comparação com o conteúdo na secção acima da enxertia. A maior acumulação na zona de enxertia sugere que o ácido cafeíco pode exercer uma ação antioxidante (Gülçin, 2006), semelhante à descrita para o ácido gálico.

III.2.3.3. Efeito do tempo na concentração de ácido cafeíco

A evolução da concentração de ácido cafeíco ao longo do ciclo de enxertia é apresentada na figura 3.10. Na fase de calogénese é detetável e quantificável, uma vez que o valor médio do conteúdo ($0,28 \pm 0,20$) se encontra dentro da gama de trabalho. Na fase de enraizamento e no final de ciclo, o teor deste ácido é detetável ($0,06 \pm 0,01$ e $0,10 \pm 0,04$ s, respetivamente), mas encontra-se abaixo do limiar de quantificação ($0,11$ mg/L; Quadro II.3).

Por este motivo, não é possível utilizar o ácido cafeíco como marcador da compatibilidade da enxertia nas fases de enraizamento e de final de ciclo.

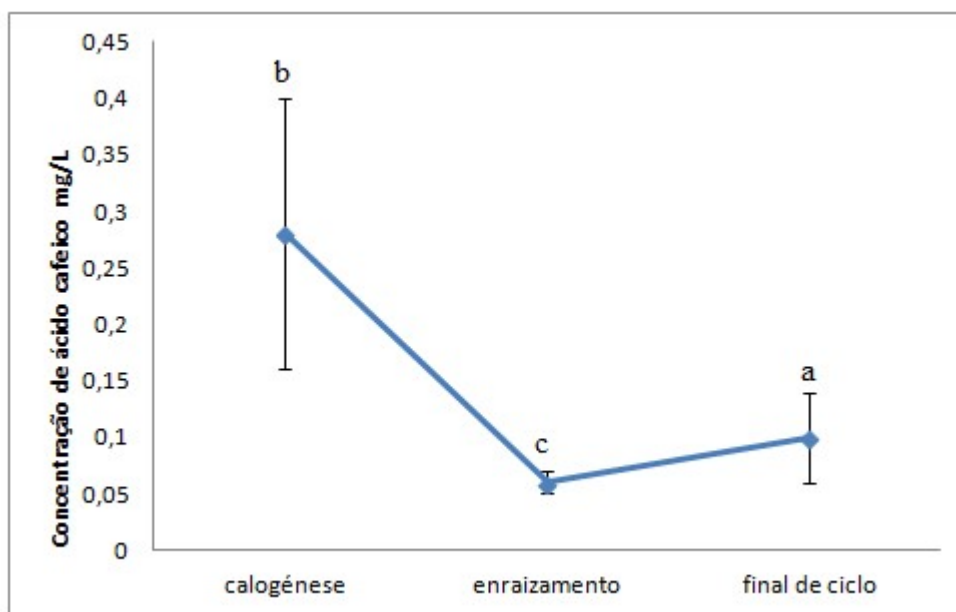


Figura 3.10 – Variação da concentração média de ácido cafeíco ao longo do ciclo de enxertia.

III.2.4. Ácido sinápico

O ácido sinápico difere do ácido cinâmico pela presença de dois grupos metoxilo e um grupo hidroxilo que se encontram nas posições três, cinco e quatro do anel aromático respetivamente (Figura 3.11), que não existem no ácido cinâmico. A fórmula molecular do composto é $C_{11}H_{12}O_5$ e a sua massa molecular 224,21 g/mol.

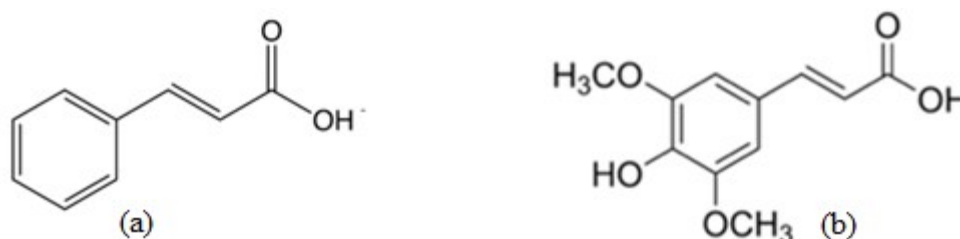


Figura 3.11 – Fórmulas de estrutura do ácido cinâmico (a) e do ácido sinápico (b).

Os resultados da ANOVA permitem determinar as diferenças entre as médias do conteúdo de ácido sinápico tendo em conta os fatores analisados (Quadro III.5).

Quadro III.5 – Concentração média de ácido sinápico (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.

efeito		***
combinação	A (112/ 110 R)	10,57 ± 4,27 b
	B (21/ 110 R)	7,90 ± 3,14 a
efeito		***
secção	acima da enxertia (a)	7,45 ± 2,58 a
	união enxertia (e)	11,10 ± 3,08 b
	abaixo da enxertia (b)	9,16 ± 5,52 a
interação	tempo x combinação	**
	tempo x secção	***
	combinação x secção	ns
	tempo x combinação x secção	ns

Efeito: ** muito significativo ($0,05 < p < 0,01$); *** altamente significativo ($p < 0,01$); ns - não significativo. Letras diferentes indicam diferença altamente significativa, de acordo com o Teste de Fisher.

III.2.4.1. Efeito da combinação na concentração de ácido sinápico

No caso do ácido sinápico, o efeito da combinação é altamente significativo, sendo o seu o conteúdo mais elevado na combinação TN 112/110 R do que na combinação TN 21/110 R. Sendo a combinação TN 112/110 R aquela que se afigura mais compatível, este resultado apresenta-se concordante com os descritos no trabalho que foi realizado com a

casta Syrah (Assunção *et al.*, 2016). Diversos trabalhos indicam que este composto está envolvido no processo de biossíntese da lenhina, atuando como agente de ligação e como estabilizador das paredes das células, contribuindo assim para a melhoria da estabilidade mecânica na união de enxertia e consequentemente para o sucesso da enxertia.

III.2.4.2. Efeito da secção na concentração de ácido sinápico

O conteúdo de ácido sinápico é significativamente mais elevado na união de enxertia, distinguindo esta secção das outras duas, em que a concentração deste ácido não é significativamente diferente. O resultado correspondente ao ácido sinápico não é concordante com os descritos na literatura (Assunção *et al.*, 2016), o que poderá indiciar que a síntese/degradação deste composto nos dois biontes e na sua união é condicionada sobretudo pela casta.

III.2.4.3. Efeito do tempo na concentração de ácido sinápico

O conteúdo de ácido sinápico diminui da calogénese ($9,27 \pm 3,37$) para a fase de enraizamento ($7,95 \pm 3,52$), voltando a aumentar no final de ciclo ($10,49 \pm 4,61$), embora sem atingir o valor inicial (Figura 3.12). Este resultado não é concordante com o obtido para a casta Syrah quando enxertada no porta-enxerto 110 R (Assunção *et al.*, 2016). Com efeito, na casta Syrah o conteúdo de ácido sinápico aumenta continuamente ao longo do ciclo de enxertia.

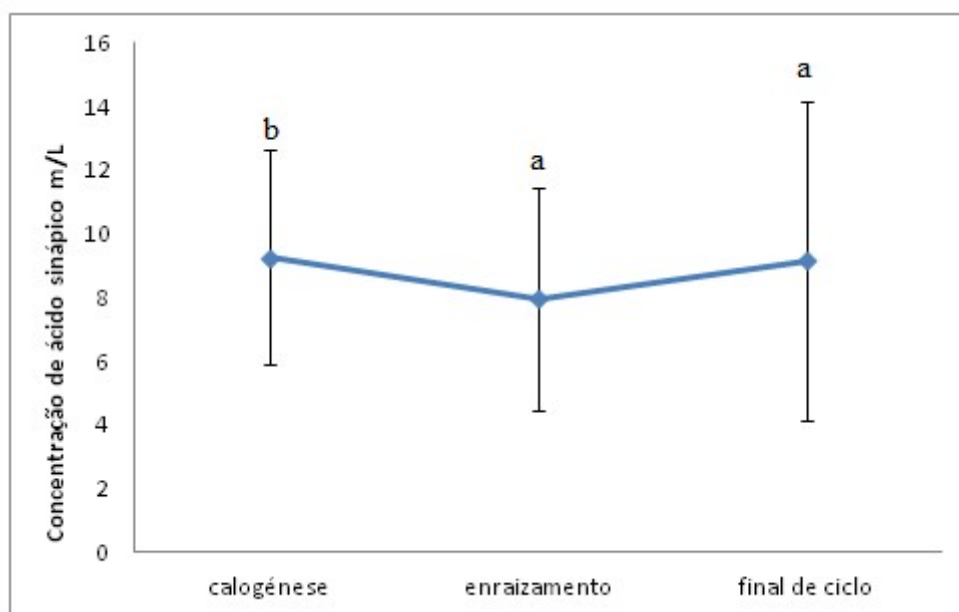


Figura 3.12 – Variação da concentração média de ácido sinápico ao longo do ciclo de enxertia.

O fator tempo permite diferenciar claramente a fase de calogénese dos outros dois estádios. O teor mais elevado deste ácido hidroxicinâmico no início do ciclo de enxertia sugere que, para além da sua possível intervenção na biossíntese da lenhina (Errea *et al.*, 2000; Boerjan *et al.*, 2003) nas fases de enraizamento e no final de ciclo, poderá estar também implicado em outro(s) evento(s) bioquímico(s) subjacente(s) à enxertia.

Analisando a interação tempo x combinação (Figura 3.13), constata-se que a evolução da concentração nas combinações é similar.

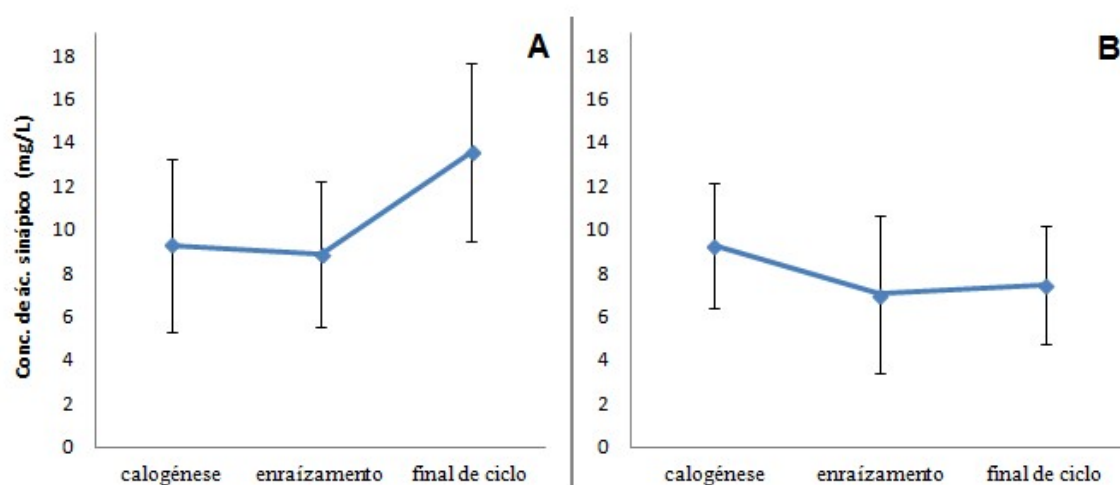


Figura 3.13 – Variação da concentração do ácido sinápico ao longo do ciclo de enxertia, para as combinações A e B.

A diferença entre as combinações reside na amplitude do decréscimo entre a calogénese e o enraizamento (mais acentuado na combinação TN 21/110 R, menos compatível) e do acréscimo entre o enraizamento e o final de ciclo (menos acentuado na combinação TN 21/110 R). Este facto pode indiciar que na combinação mais compatível na fase de final de ciclo continua ainda um processo de lenhificação muito ativo, sendo menos intenso na mesma fase do ciclo para a combinação menos compatível. Como referido anteriormente (ver III.2.4.1), ao ácido sinápico são atribuídas funções na biossíntese da lenhina, contribuindo para a melhoria da estabilidade mecânica na união de enxertia e consequentemente para o sucesso da enxertia.

Relativamente à interação tempo x secção, observa-se que a evolução da concentração de ácido sinápico nas três secções é semelhante (Figura 3.14).

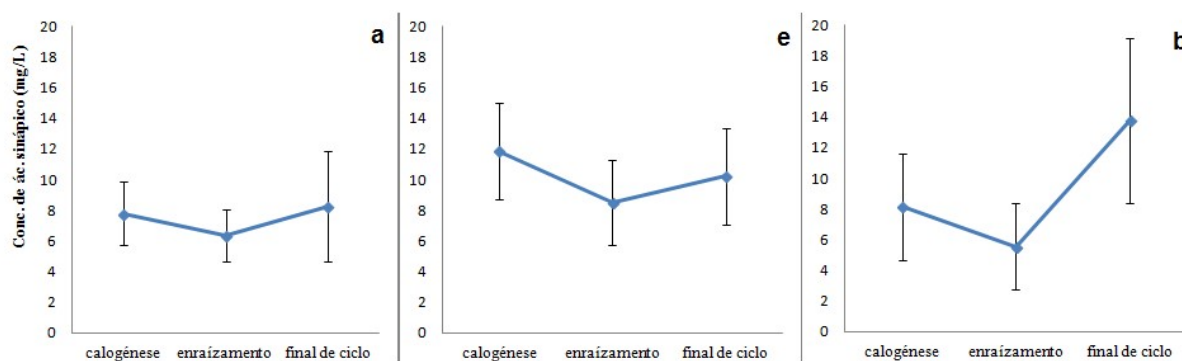


Figura 3.14 – Variação da concentração de ácido sinápico ao longo do ciclo de enxertia, nas secções a, b, e.

A diferença entre as secções deve-se à amplitude do decréscimo entre a calogénese e o enraizamento e do incremento entre o enraizamento e o final de ciclo.

III.3. Flavanóis (catequina e epicatequina)

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos nas plantas, abrangendo cerca de metade dos oito mil compostos fenólicos que ocorrem na natureza (Balasudram *et al.*, 2006). A estrutura química geral dos flavonóides encontra-se representada na figura 3.15. Um flavonoide é caracterizado pela presença de dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma ponte de três átomos de carbono que formam o anel heterocíclico oxigenado (C), isto é, tem como estrutura básica C6-C3-C6.

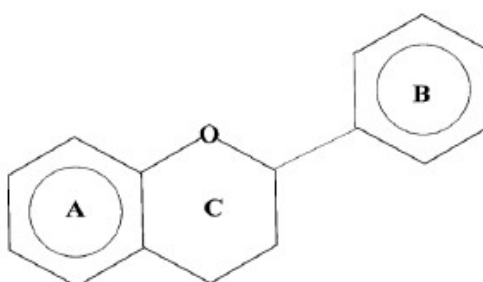


Figura 3.15 – Esquema representativo da estrutura geral dos flavonóides.

Consoante as variações no anel heterocíclico, também eles podem ser agrupados em diferentes subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas, flavanonóis e antocianidinas. Substituições nos anéis A e B dão origem a diferentes compostos dentro de cada classe. Estas substituições podem incluir oxigenação,

alquilação, glucosilação, acilação e sulfatação (Balasudram *et al.*, 2006). Reações como a glucosilação tornam os flavonóides mais solúveis em água e permitem o seu armazenamento no vacúolo celular, onde são geralmente encontrados nas plantas.

As unidades monoméricas de flavanóis, mais conhecidas como catequinas, são encontradas em diversos frutos, incluindo a uva. Por isso será natural encontrá-las também em tecidos de videira. A (+)-catequina e a (-)-epicatequina (isómeros óticos ou enantiómeros) são os principais flavanóis nos frutos. Na figura 3.16 pode observar-se as duas estruturas, que apenas variam na orientação do anel aromático. Na (+)-catequina em projeção de Fischer o anel orienta-se para trás do plano da folha, enquanto na (-)-epicatequina esse anel orienta-se para a frente do plano da folha.

Como são isómeros, os dois compostos têm a mesma fórmula química e a mesma massa molecular. A fórmula química é $C_{15}H_{14}O_6$ e a massa molecular é 290,26 g/mol.

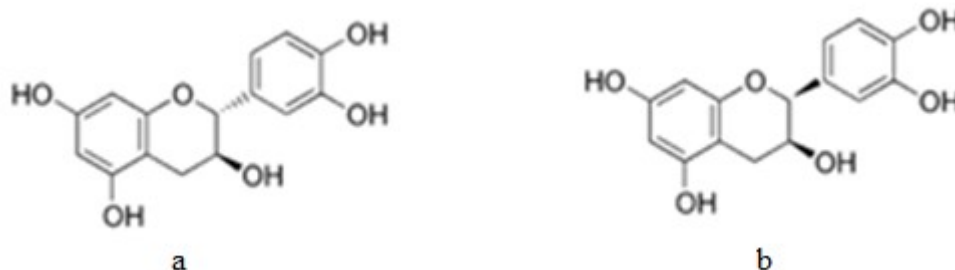


Figura 3.16 - Estrutura dos flavanóis (+)-catequina (a) e (-)-epicatequina (b).

Ao contrário dos outros flavonóides, estes compostos encontram-se geralmente na forma de aglicona, em vez da forma glicosilada (Robards e Antolovich, 1997). Quando presentes na forma dimérica, oligomérica ou polimérica, denominam-se proantocianidinas ou taninos condensados (Daayt e Lattanzio, 2008) e são responsáveis pela adstringência da uva (Santos e Scalbert, 2000).

III.3.1. Catequina

Os resultados obtidos na análise de variância mostram o efeito dos fatores em estudo no conteúdo de catequina (Quadro III.6).

Quadro III.6 – Concentração média de catequina (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.

combinação	efeito	*
	A (TN 112/110 R)	13,19 ± 5,13 b
	B (TN 21/110 R)	11,78 ± 5,16 a
secção	efeito	ns
	acima da enxertia (a)	11,60 ± 3,70
	união enxertia (e)	12,47 ± 5,48
	abaixo da enxertia (b)	13,38 ± 1,99
interação	tempo x combinação	**
	tempo x secção	**
	combinação x secção	ns
	tempo x combinação x secção	ns

Efeito: * significativo ($p < 0,05$); ** muito significativo ($0,05 < p < 0,01$); ns - não significativo.
 Letras diferentes indicam diferença significativa, de acordo com o Teste de Fisher.

III.3.1. 1. Efeito da combinação na concentração de catequina

O efeito da combinação é significativo para a catequina, mostrando-se concordante com o descrito na literatura (Assunção *et al.*, 2016), para a casta Syrah enxertada no mesmo porta-enxerto. Assim, este composto pode constituir um marcador químico nas questões de compatibilidade de enxertia.

Por outro lado, o teor de catequina é superior ao teor de epicatequina, em ambas as combinações. Também o trabalho que estudou a compatibilidade da enxertia de Syrah com o porta-enxerto 110 R evidencia o mesmo facto.

III.3.1. 2. Efeito da secção na concentração de catequina

Após análise dos testes de significância, constata-se que a catequina não permite a diferenciação das secções pois este efeito apresenta-se como sendo não significativo. Este resultado vai ao encontro do obtido no trabalho onde se estudou a compatibilidade da casta Syrah com o mesmo porta-enxerto (Assunção *et al.*, 2016).

III.3.1. 3. Efeito do tempo na concentração de catequina

Durante o ciclo de enxertia, o conteúdo de catequina diminui progressivamente da calogénese ($17,46 \pm 2,91$) para o final de ciclo ($12,37 \pm 4,22$); a fase de enraizamento apresenta um valor intermédio ($7,61 \pm 2,19$) – figura 3.17.

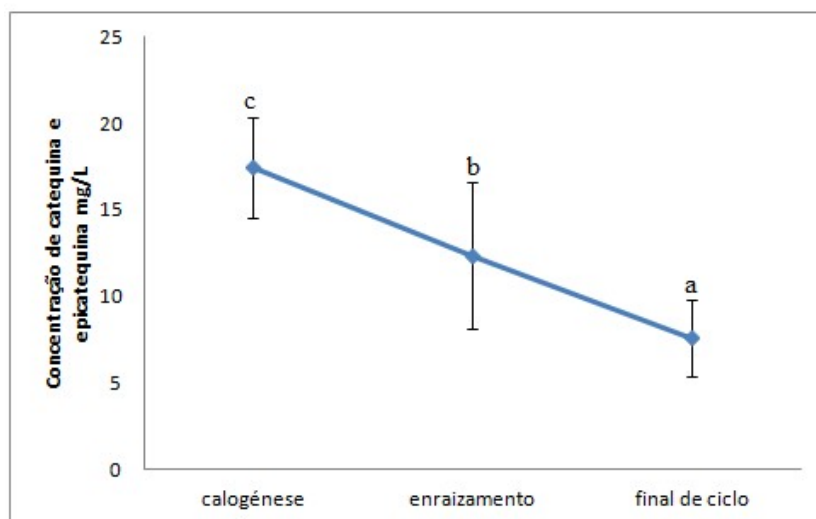


Figura 3.17 – Variação da concentração média de catequina ao longo do ciclo de enxertia.

À semelhança do ácido gálico e do ácido cafeico, a maior concentração de catequina no início do ciclo de enxertia tem sido associada à sua elevada atividade antioxidante (Errea *et al.*, 2000; Garrido e Borges, 2013). A acumulação pode resultar de uma maior concentração de assimilados, especialmente açúcares, que são transportados pelo floema e levam ao aumento da síntese de flavanóis (Errea *et al.*, 2000).

A interação dos fatores tempo x combinação é muito significativa, pelo que a variação do teor de catequina para cada combinação ao longo do ciclo de enxertia é representada na figura 3.18.

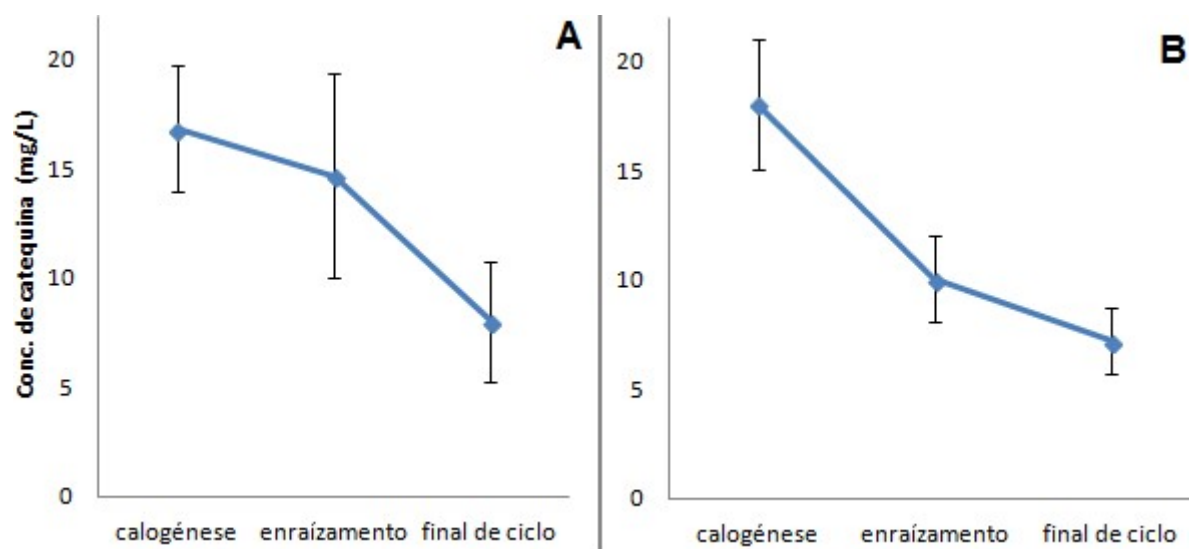


Figura 3.18 – Variação da concentração de catequina ao longo do ciclo de enxertia para as combinações A e B.

A evolução do teor de catequina é similar nas duas combinações, sendo a interação motivada pela diferença dos decréscimos entre cada fase do ciclo de enxertia, que são mais acentuados na combinação TN 21/110 R (menos compatível).

A interação tempo x secção é ilustrada na Figura 3. 19.

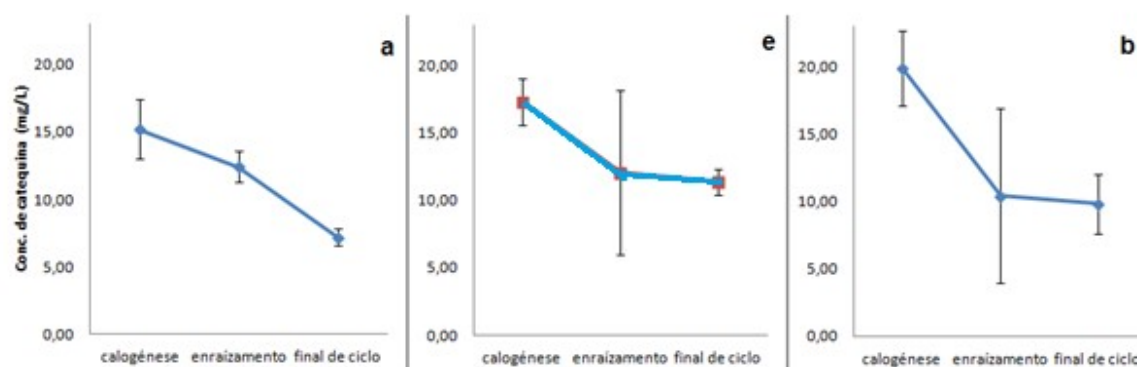


Figura 3.19 – Variação da concentração de catequina ao longo do ciclo de enxertia nas secções a, e, b.

Os perfis dos conteúdos de catequina são semelhantes nas três secções, diferindo apenas na amplitude dos decréscimos entre cada fase do ciclo de enxertia.

III.3.2. Epicatequina

Os resultados obtidos na análise de variância mostram o efeito dos fatores em estudo nos conteúdos da epicatequina (Quadro III.7).

Quadro III.7 – Concentração média de epicatequina (mg/L) nas combinações casta/porta-enxerto e nas secções da enxertia.

combinação	efeito	ns
	A (TN 112/110 R)	3,23 ± 1,75
	B (TN 21/110 R)	3,33 ± 1,92
secção	efeito	***
	acima da enxertia (a)	4,09 ± 1,69 c
	união enxertia (e)	2,29 ± 1,49 a
	abaixo da enxertia (b)	3,46 ± 0,92 b
interação	tempo x combinação	***
	tempo x secção	***
	combinação x secção	ns
	tempo x combinação x secção	ns
Efeito: *** altamente significativo ($p < 0,01$); ns - não significativo. Letras diferentes indicam diferença altamente significativa, de acordo com o Teste de Fisher.		

III.3.2. 1. Efeito da combinação na concentração de epicatequina

O efeito da combinação não é significativo para a epicatequina, evidenciando falta de concordância com o descrito na literatura (Assunção *et al.*, 2016) relativamente à compatibilidade entre a casta Syrah e o porta-enxerto 110 R. Portanto, a epicatequina não poderá constituir um marcador químico da compatibilidade da enxertia de clones da casta Touriga Nacional com o porta-enxerto 110 R.

III.3.2. 2. Efeito da secção na concentração de epicatequina

O efeito da secção é altamente significativo no conteúdo da epicatequina. O conteúdo em epicatequina é superior acima da enxertia por comparação com a secção abaixo da enxertia. Este facto está de acordo com a análise feita para a casta Syrah (Assunção *et al.*, 2016) e que já havia sido descrito em outro trabalho (Musacchi *et al.*, 2000) sobre a compatibilidade da enxertia em marmeleiro. De acordo com este último trabalho, a acumulação de epicatequina acima da zona da enxertia pode ser um indicador de falta de compatibilidade.

III.3.2. 3. Efeito do tempo na concentração de epicatequina

O perfil da epicatequina é diferente da evolução da catequina, na medida em que aumenta da fase de enraizamento para o final de ciclo. Na calogénese o conteúdo médio tem o valor $3,87 \pm 2,03$ mg/L, na fase de enraizamento o valor médio é de $1,71 \pm 0,95$ mg/L, e no final de ciclo, o valor médio é de $4,27 \pm 1,14$ mg/L (Figura 3.20).

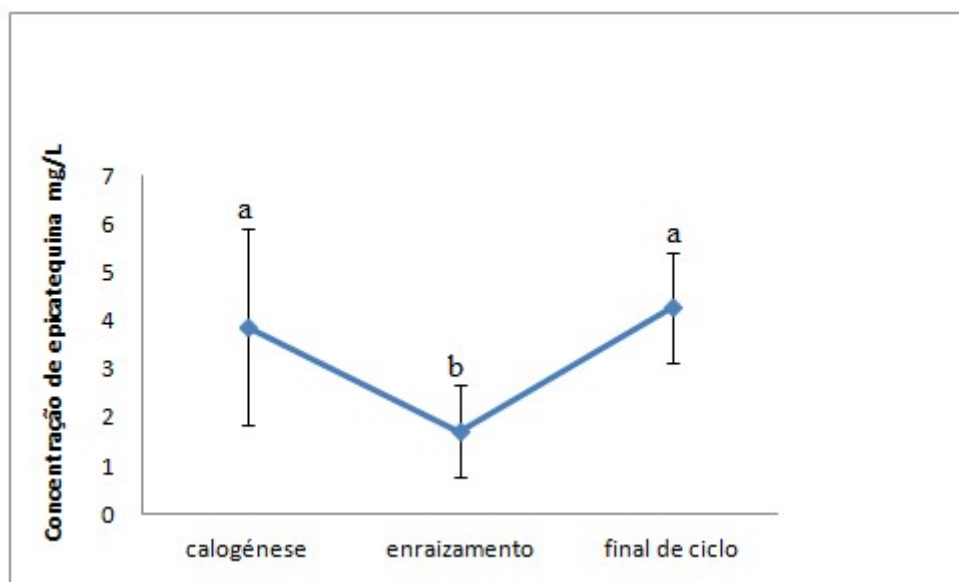


Figura 3.20 – Variação da concentração média de epicatequina ao longo do ciclo de enxertia.

O facto de a concentração de epicatequina aumentar no terceiro estágio do ciclo mostra-se concordante com o referido por Assunção *et al.* (2016). Este resultado indica que o teor de epicatequina permite diferenciar a fase de enraizamento das outras duas fases do ciclo de enxertia.

A análise de variância permite verificar que as interações dos fatores tempo x combinação e tempo x secção são altamente significativas para a epicatequina, pelo que a sua análise é detalhada na figura 3.21 e na figura 3.22, respetivamente.

Os perfis de epicatequina para as duas combinações são semelhantes, diferindo apenas na taxa de diminuição e de aumento entre as fases do ciclo de enxertia.

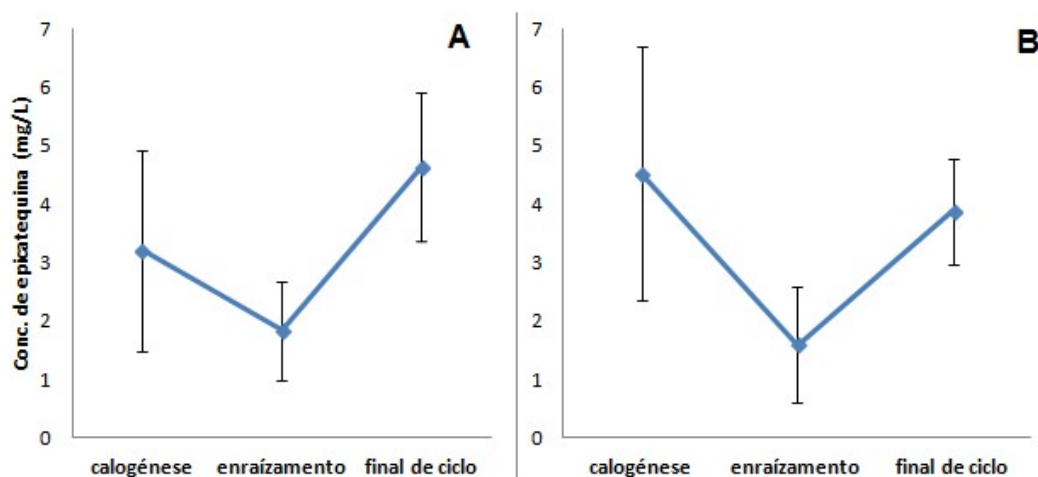


Figura 3.21 – Variação da concentração de epicatequina ao longo do ciclo de enxertia para as combinações A e B.

Os perfis dos conteúdos de epicatequina nas secções acima e abaixo da enxertia são similares. A secção correspondente à união de enxertia tem um comportamento completamente diferente e exibe teores mais baixos deste flavanol.

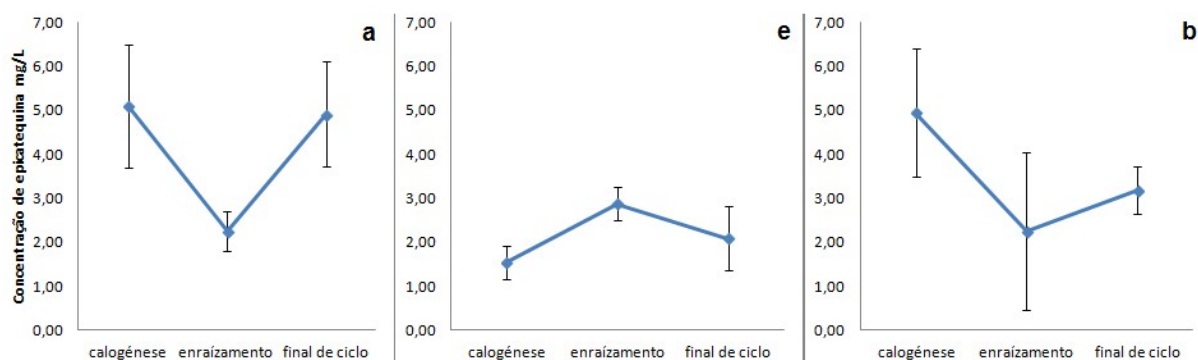


Figura 3.22 – Variação da concentração de epicatequina ao longo do ciclo de enxertia nas secções a, e, b.

IV. Conclusões

Considerando as condições experimentais deste ensaio é possível concluir que:

- A concentração dos ácidos fenólicos (ácidos gálico, ferúlico, clorogénico, cafeíco e sinápico) e dos flavanóis (catequina e epicatequina) estudados nas plantas enxertadas é influenciada, diferencialmente, pela combinação casta/porta-enxerto e pela fase do ciclo de enxertia, o que evidencia o seu distinto envolvimento nos mecanismos bioquímicos subjacentes à enxertia.
- A acumulação da maioria destes compostos nos tecidos da união da enxertia e das secções imediatamente adjacentes das combinações dos clones da casta Touriga Nacional com o porta-enxerto 110 R apresenta particularidades, mas torna-se possível identificar um aspeto em comum: concentração significativamente mais elevada na união da enxertia. A exceção reside na catequina, cujos teores nas secções estudadas não se diferenciam, e na epicatequina, com concentração mais elevada acima da enxertia.
- Dos sete compostos analisados, apenas o ácido cafeíco, o ácido sinápico e a catequina são compostos responsáveis pela diferenciação das combinações de clones da casta Touriga Nacional com o porta-enxerto 110 R, com distinto grau de compatibilidade.
- Comparando com os compostos fenólicos que se mostraram discriminantes para as combinações de clones da casta Syrah com o mesmo porta-enxerto (ácidos gálico, ferúlico e sinápico), constata-se que somente o ácido sinápico poderá constituir um potencial marcador químico a utilizar na deteção precoce da compatibilidade da enxertia.
- Teores mais elevados de ácido sinápico permitem distinguir combinações casta/porta-enxerto mais compatíveis (TN 112/110 R e Syrah 470/110 R) de combinações menos

compatíveis (TN 21/110 R e Syrah 383/110 R). A maior acumulação de ácido sinápico nas combinações mais compatíveis é atribuída ao papel deste composto na biossíntese da lenhina, atuando como agente de ligação e como estabilizador das paredes das células, contribuindo assim para a melhoria da estabilidade mecânica na união da enxertia e, conseqüentemente, para o sucesso da enxertia.

- Relativamente ao ciclo de enxertia e para as combinações da casta Touriga Nacional com o porta-enxerto 110 R, a concentração média de ácido sinápico diminui da calogénese para a fase de enraizamento, voltando a aumentar no final de ciclo, embora sem atingir o valor inicial. O teor mais elevado deste ácido hidroxicinâmico no início do ciclo de enxertia sugere que, para além da sua possível intervenção na biossíntese da lenhina nas fases de enraizamento e no final de ciclo, poderá estar também implicado em outro(s) evento(s) bioquímico(s) subjacente(s) à enxertia.

Após a realização deste trabalho, confirma-se que ainda existe muito pouca literatura que estude a compatibilidade de enxertia em videiras, sendo necessário continuar a estudar este fenómeno. Neste sentido, apresentam-se algumas possibilidades de aprofundamento em trabalhos futuros.

Como o comportamento da casta Touriga Nacional em algumas situações é diferente do descrito para a casta Syrah, será necessário encontrar algum processo de controlo que permita esclarecer se a acumulação de compostos fenólicos é exclusivamente provocada pelo processo de enxertia, ou se é uma característica intrínseca da casta de *Vitis vinífera* ou do porta-enxerto. De modo a clarificar esta dúvida seria importante realizar enxertias intraespecíficas, isto é, enxertar o porta-enxerto no próprio porta-enxerto e os clones das variedades de *Vitis vinífera* nos próprios (enxertando o clone TN 112 em TN112 e TN 21 em TN 21), efetuando o mesmo procedimento com os clones de Syrah descritos por Assunção *et al.* (2016).

Outra linha de investigação poderia assentar no alargamento a outras castas muito utilizadas na viticultura nacional, como é o caso da Touriga Franca (Touriga Francesa), uma vez que esta casta é descrita como um cruzamento da Touriga Nacional e do Mourisco Tinto, poderia assim verificar-se se o híbrido se comporta ao nível da compatibilidade como alguma das castas que deram origem a esse cruzamento.

V. Bibliografia

- Ahmad P., Sarwat M., Sharma S., **2008**. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *J. of Plant Biol.*, 51,167-173.
- Akinnifesi, F., Kwesiga, F., Mhango, J., Chilanga, T., Mkonda, A., Kadu, C., Kadzere, I., Mithofer, D., Saka, J., Sileshi, G., Ramadhani, T., Dhliwayo, P., **2006**. Towards the development of Miombo fruit trees as commercial tree crops in southern Africa. *Forest Trees Livelihood* 16, 103–121.
- Ali K., Maltese F., Choiy H., Vepoorte R., **2010**, Metabolic constituents of grapewine and grape –derived products. *Phytochem. Rev.*, 9, 357 -378.
- Aloni B, Karni L, Deventurero G, **2008**. Physiological and biochemical changes at the rootstock–scion interface in graft combinations between Cucurbita rootstocks and a melon scion. *J Hortic Sci Biotech.*, 83,777–83.
- Aloni B, Cohen R, Karni L, Aktas H, Edelstein M., **2010**. Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. *Sci Hortic.*, 127,119–26.
- Assunção, M., Canas, S., Brazão, J., Zanol G. Eiras – Dias J., **2016**. Graft compatibility of *Vitis* spp. : the role of phenolic acids and flavanols”. *Sci. Hortic.*, 207, 140 – 145.
- Atkinson, C.J., Else, M.A., **2001**. Understanding how rootstock dwarf fruit trees. *Compact Fruit Tree* 34, 46–49.
- Baba K, Karlberg A, Schmidt J, Schrader J, Hvidsten TR, Bako, L, Bhalerao RP. **2011**. Activity–dormancy transition in the cambial meristem involves stage-specific modulation of auxin response in hybrid aspen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108, 3418–3423.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S., **2006**. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99,191-203.
- Batovska D., Todorova I., D.V. Nedelcheva, S.P. Parushev, A.I. Atanassov, T.D. Hvarleva, G.J. Djakova, V.S. Bankova, S.S. Popov, **2008**. Preliminary study on biomarkers for the fungal resistance in *Vitis vinifera* leaves, *J. Plant Physiol.*, 165, 791-795.
- Bennett, R. Wallsgrove, R. **1994**. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.*, 127, 617 – 633.
- Blanchfield A., Robinson S., Renzullo L., Powell K., **2006**. Phylloxera-infested grapevines have reduced chlorophyll and increased photoprotective pigment content e can leaf pigment composition aid pest detection. *Funct. Plant Biol.*, 33, 507-514.

- Boerjen W. e Ralph, J., Baucher, M. , **2003**. Lignin biosynthesis *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 519-546.
- Bordin I., Hidalgo P., Bürkle R., Roberto S., **2005**. Efeito da presença da folha no enraizamento de estacas semilenhosas de porta-enxertos de videira. *Ciência Rural*. 35, 215-218.
- Browning G., Watkins R. .**1991**. Preliminary evaluation of new quince (*Cydonia oblonga* Miller) hybrid rootstocks for pears. *J Hortic Sci Biotechnol.*, 66, 35–42.
- Buchloh G. .**1960**. The lignification in stock-scion junctions and its relation to compatibility. In: Pidham JB (ed) Phenolic in Plants in Health and Disease. *Pergamon Press*, Oxford, 67–71
- Cambra, R., **1986**. Compatibilidad de variedades de albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) con híbridos de almendro _ melocotonero (*Prunus amygdalo- persica* (west) Rehd). *An. Aula Dei.*, 18 (1–2), 87–90.
- Campbell C., **2004**. Phylloxera: How Wine was Saved for the World. *Harper Collins Publishers*, London
- Canas, S., Assunção, M. Brazão, J., Zanol G., Eiras – Dias J.. **2015**. Phenolic Compounds Involved in Grafting Incompatibility of *Vitis* spp: Developmentt and Validation of an analytical Method for their Quantification. *Phytochem. Anal.*, 26, 1-7.
- Cioboratti, G., Brinza, M., Morariu, A. , Gradinariu, G., **2010**. Graft incompatibility influence na assimilating pigments and soluble sugars amount some pear (*Pyrus sativa*) cultivars. *Not. Bot. Hortic. Agrobot. Cluj.*, 38, 187 – 192.
- Cookson S, Moreno M, Hevin C, Mendome L, Delrot S, Trossat-Magnin C, Ollat N. **2013**. Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. *J. of Experim. Botany*, 64, 10, 2997–3008.
- Cresswell R. and Nitsch C. . **1975**. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. *L. Planta*, 125, 87-90
- Cunha A.; Chaves F.; Batista A.; Hidalgo A., **2015**. Propagação vegetativa de estacas de *Piper hispidum* Sw. em diferentes substratos. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 17(4-I), 685-692.
- Daayf F, Lattanzio, **2008**. Recent Advances in Polyphenol Research, vol I: *Blackwell Publishing Ltd*.
- Davis A., Perkins-Veazie, P., Sakata Y., López-Galarza S., Maroto J., Lee S., Huh Y., Sun Z., Miguel A., King S., Cohen R., Lee J., **2008**. Cucurbit grafting. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 27, 50–74.

- DeCooman, L., Everaert, E., Curir, P., Dolci, M., **1996**. The possible role of phenolics in incompatibility expression in *Eucalyptus gunnii* micrografts. *Phytochem. Anal.*, 7 (2), 92–96.
- Deloire A., Hebant C., **1982**. Peroxidase activity and lignification at the interface between stock and scion of compatible and incompatible grafts of *Capsicum* on *Lycopersicon*” *Ann Bot.*, 49: 887– 891
- Denisova T., **1965**. The phenolic complex of vine roots infested by phylloxera as a factor in resistance. *Vestnik Selskokhoziaistvennoi Nauki.*, 10, 114-118.
- Dicke M., Van Beek T., Posthumus M., Ben Dom N., Van Bokhoven H., De Groot A., **1990**. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions involvement of host plant in its production. *J. Chem. Ecol.*, 16, 381-396.
- Druart N, Johansson A, Baba K, Schrader J, Sjodin A, Bhalerao RR, Resman L, Trygg J, Moritz T, Bhalerao RP., **2007**. Environmental and hormonal regulation of the activity–dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks. *The Plant Journal*, 50, 557–573.
- Duarte M., Dias J., **1987**. Catálogo de Porta-Enxertos mais utilizados em Portugal. Instituto da Vinha e do Vinho, Divisão de Cadastro Vitícola, Lisboa
- Duquesne, J., **1969**. Etude de la compatibilité de greffe de quelques cultivars de *Prunus armeniaca* (Koehne) sur divers types de *Prunus* I. Compatibilité des cultivars “Canino” et “Rouge du Roussillon” sur divers clones de “*Prunus cerasifera* (Ehrh.) et hybrides interspécifiques . *Ann. Ame’lior. Plantes.*, 19, 4, 419–441.
- Durrant WE, Dong X., **2004**. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42, 185-209.
- Eiras – Dias J., Faustino R., Clímaco P., Fernandes P., Cruz A., Cunha J., Veloso M., Castro R., **2011**. Catálogo das Castas para Vinho Cultivadas em Portugal – Volume I , 1ª edição, *Instituto da Vinha e do Vinho*, ISBN: 978-972-8987-21-3
- Ermel, F.F, Catesson, A.M., Poessel, J.L., **1995**. Early histological diagnosis of apricot/peach x almond graft incompatibility: statistical analysis of data from 5-month-old grafts. *Acta Hort.*, 384, 497–503.
- Ermel F., Poessel J., Faurobert M., Catessons A., **1997**. Early scion/stock junction in compatible and incompatible pear/pear and pear/quince grafts: a histo-cytological study. *Ann Bot-London*, 79,505–15.
- Errea P. , Felipe A. , Herrero M. .**1994**. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp. *J. Exp. Bot.*, 45, 393 – 401.

- Errea, S., Felipe, A., Treutter, D., Feucht, W., **1994b**. Flavanol accumulation in apricot grafts as a response to incompatibility stress. *Acta Hortic.*, 381, 498–501.
- Errea P. **1998**. Implications of phenolic compounds in graft incompatibility in fruit treespecies. *Sci Hortic.*, 74, 195–205.
- Errea, P., Felipe, A., Herrero, M., **1994c**. Graft establishment between compatible and incompatible *Prunus* spp., *J. Exp. Bot.*, 45 (272), 393–401.
- Errea, P., Gutmann, M., Feucht, W., **2000**. Physiological implications of flavan-3-ols in apricot-rootstock combinations. *Adv. Hort. Sci.*, 14, 126-134.
- Errea P, Garay L, Marin JA., **2001**. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using in vitro techniques. *Physiol. Plantarum.*, 112, 135–41.
- Errea P. **2005**. A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. *Sci. Hortic.*, 106, 1–11.
- Espen L. , Cocucci M. , Sacchi G. . **2005**. Differentiation and functional connection of vascularelements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts”. *Tree Physiol.* ; 25, 1419–25.
- Facteau, T.J., Chestnut, N.E., Rowe, K.E., **1996**. Tree, fruit size and yield of ‘Bing’ sweet cherry as influenced by rootstock, replant area and training system. *Sci. Hort.*, 67, 13–26.
- Fernandez-Garcia, N., Carvajal, M., Olmos, E., **2004**. Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Ann. Bot.*, 93 (1), 53–60.
- Feucht,W., **1988**. Graft incompatibility of tree crops: an overview of the present scientific status. *Acta Hortic.*, 227, 33–41.
- Feucht, W., Treutter, D., **1991**. Phenol gradients in opposing cells of *Prunus* heterografts. *Adv. Horticult. Sci.*, 5, 107–111.
- Forneck A., Walker M.A., Blaich R., **2001**. Ecological and genetic aspects of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae) performance on rootstock hosts- B. *Entomol. Res.*, 91, 445-451.
- Forneck A, Kleinmann S, Blaich R, Anvari S., **2002**. Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis* spp). *Vitis*. 41, 93-97.
- Garrido, J.. **2012**. Enxerto - pronto: Uma afirmação na viticultura portuguesa. *AGROTEC*, 5, 106-108.
- Garrido J., Borges F., **2013**. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*. 54, 1844–1858
- Gebhardt K. and Goldbach H. . **1988**. Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiol Plant*, 72, 153–159 .

- Gersani M. **1985**. Appearance of new transport capacity in wounded plants. *J. Exp. Bot.*, 36, 1809–1816.
- Gokbaysak, Z., Soylemezoglu, G., Akkurt, M., CeliK, H., **2007**. Determination of grafting, compatibility of grapevine with electrophilic methods. *Sci. Hortic.*, 113, 343 – 352.
- Granett J., Timper P., Lider L., **1985**. Grape Phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) (Homoptera: Phylloxeridae) biotypes in California. *J. Econ. Entomol.*, 78, 1463-1467.
- Granett J, Walker MA, Kocsis L, Omer A., **2001**. Biology and management of grape phylloxera. *Annual Review of Entomology*, 46, 387-412.
- Rubbs F. E., **1950**. Sample Criteria for Testing outlying observations in samples. *Annales of Matematical Statistics*, 21, 27-28.
- Gulen, H., Arora, R., Kuden, A., Krebs, S.L., Postman, J., **2002**. Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear-quince graft combinations. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 127 (2), 152–157.
- Gülçin, I., **2006**. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gur A., Samish R., Lifshitz E. **1968**. The role of cyanogenic glycoside of the quince in the incompatibility between pear cultivars and quince rootstocks. *Hortic Res.*, 8, 113–34.
- Hahlbrock, K., Shell, D., **1989**, Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, 40. 347-369.
- Hamisy, W., **2004**. Promotion of effective conservation and sustainable utilization of *Uapaca kirkiana* Muell Arg. Project report, ICRAF Nairobi, Kenya, p. 17.
- Hansch, R., Mendel, R.R., **2009**. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, 259–266.
- Harborne, J.B., **1989**. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne, J.B. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 1–28.
- Hartmann H., Kester D., Davies F., Geneve R., **1997**. Plant Propagation. Principles and practices, 6th Edn. Prentice-Hall”, Upper Saddle River, NJ, 757 pp. ISBN 0-13-206103-1.
- He, Y., Zhu, Z.J., Yang, J., Ni, X.L., Zhu, B., **2009**. Grafting increases the salt tolerance of tomato by improvement of photosynthesis and enhancement of antioxidant enzymes activity. *Environ. Exp. Bot.*, 66, 270–278.
- Herrero J., **1951**. “Studies of compatible and incompatible graft combinations with special reference to hardy fruit trees. *J. Hort. Sci.*, 26, 186–237.

- Herrero, J., **1956**. Incompatibilidad entre patron-variedad. III. Comparación de síntomas producidos por incompatibilidad y por el anillado del tronco. *Anales de La Estación Experimental de Aula Dei*, 4, 262-264.
- Hirai M., Yano M., Goodenowe D., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K., **2004**. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.* 101
- Hofmann E., **1957**. Die histologie de nodositaten verschiedener rebensorten bie reblausbefall. *Vitis* 1, 125-141.
- Hofmann J., El Ashry A., Anwar S., Erban A., Kopka J., Grundler F., **2010**. Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *Plant J.*, 62, 1058-1071.
- Hudina M., Orazem P., Jakopic J., Stampar F. , **2014**. The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *J. of Plant Physiol.*, 171, 76– 84.
- Irisarri P., Binczycki P., Errea P., Martens H., Pina A., **2015**. Oxidative stress associated with rootstock–scion interactions in pear/quince combinations during early stages of graft development. *J. of Plant Physiol.*, 176, 25–35.
- Jay-Allemand C., Cornu D., Macheix J. J., **1988**. Biochemical attributes associated with rejuvenation of walnut tree. *Plant Physiol. Biochem.*, 26, 139-144.
- Johkan, M., Mitukuri, K., Yamasaki, S., Mori, G., Oda, M., **2009**. Causes of defoliation and low survival rate of grafted sweet pepper plants. *Sci. Hortic.*, 119, 103–107.
- Jonard R., Lukman D., Schall F. and Villemur, P. **1990**. Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using *in vitro* techniques. *Sci. Hortic.*, 43, 117-128.
- Kawaguchi, M., Taji, A., Backhouse, D., Oda, M., **2008**. Anatomy and physiology of graft incompatibility in solanaceous plants. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 83, 581–588.
- Keeley K., Preece J., Taylor B., **2003**. Increased rooting of “Norton” grape cuttings using auxins and gibberellin biosynthesis inhibitors. *Hort. Sci.*, 38, 281-283.
- Kellow A., **2000**. A study of the interaction between susceptible and resistant grapevines and phylloxera, PhD Thesis, *The University of Adelaide*, Australia.
- Kellow A., McDonald G, Corrie A., Heeswijck R., **2002**. In vitro assessment of grapevine resistance to two populations of phylloxera from Australian vineyards. *Aust. J. of Grape and Wine Research*, 8, 109-116.

- Kellow, A., Sedgley M., Heeswijck R., **2004**. Interaction Between *Vitis vinifera* and Grape Phylloxera: Changes in Root Tissue During Nodosity Formation. *Annals of Botany.*, 93, 581-590.
- Lachaud S. **1989**. "Participation of auxin and abscisic acid in the regulation of seasonal variations in cambial activity and xylogenesis". *Trees-Structure and Function*, 3, 125–137.
- Lapins, K., **1959**. Some symptoms of stock-scion incompatibility of apricot varieties on peach seedling rootstock. *Can. J. Plant Sci.*, 39, 194–203.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T. and Cardinali, A., **2006**. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Imperato F, ed. Phytochemistry: Adv. in Research, Signpost: Trivandrum*, India, 23–67.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Quideau, S. and Treutter, D., **2008**. Plant Phenolics – Secondary Metabolites with Diverse Functions, in *Recent Advances in Polyphenol Research*, Volume 1 (eds F. Daayf and V. Lattanzio), *Wiley-Blackwell*, Oxford, UK,
- Lawo N., Weingart G., Schuhmacher, R., Forneck A., **2011**. The volatile metabolome of grapevine roots: First insights into the metabolic response upon phylloxera attack. *Plant Phy. and Biochem.*, 49, 1059-1063.
- Lee, J.M., **1994**. Cultivation of grafted vegetables. Current status, grafting methods and benefits. *Hortic. Sci.*, 29, 235–239.
- Lee, J.M., Oda, M., **2003**. Grafting of herbaceous vegetable and ornamental crops. *Hortic. Rev.*, 28, 61–124.
- Lee, S.H., Chung, G.C., Steudle, E., **2005**. Gating of aquaporins by low temperature in roots of chilling sensitive cucumber and chilling tolerant figleaf gourd. *J. Exp. Bot.*, 56, 985–995.
- Lee, J., Kubota C, Tsao SJ, Bie Z, Echevarria PH, Morra L, Oda M., **2010**. Current status of vegetable grafting: diffusion, grafting techniques, automation. *Sci. Hortic.*, 127, 93–105.
- Legros, J., **1993**. L' invasion du vignoble par le phylloxera. *Bull. L'Académie dees Sciences et Lettres de Montpellier*, 24, 1 – 17.
- Lin KH, Chao P., Yang C., Cheng W., Lo H., Chang T., **2006**. The effects of flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47, 417-426.
- Macheix J., Fleuriet A., Quessada M., **1986**. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting". In: *Greppin H, Penel C, Gaspar T (eds) Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Université de Gene`ve, Gene`ve*, 267–286.

- Magalhães N., **2015**. Tratado de Viticultura a videira, a vinha e o terroir. *Esfera Poética*, 2ª Edição, Lisboa, Portugal.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L., **2004**. Polyphenols food sources and bioavailability. *Am. J. of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N. e Rossi, C., **2009**. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International journal of antimicrobial agents*, 34, 1: 50-59.
- Miele A.; Rizzon L.; Giovannini E., **2009**. Efeito do porta-enxerto no teor de nutrientes em tecidos da videira Cabernet Sauvignon. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31, 1141-1149.
- Mikulič-Petkovšek, M., Štampar, F. and Veberič, R., **2009**. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 60–67.
- Mikulič-Petkovšek, M., Slatnar, A., Štampar, F. and Veberič, R. **2011**. Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biologia Plantarum*, 55, 725–730.
- Milien, M., Renault – Spilmont, A., Cookson, S., Sarrazin, A., Verdeil, J. **2012**. Visualizacion of 3D structure of the graft union of grapevine using X – ray tomography” *Sci. Hortic.*, 144, 130 -140.
- Miller H., Barnett J. . **1993**. The structure and composition of bead-like projections on Sitka spruce callus cells formed during grafting and in culture. *Ann Bot*, 72, 441–448.
- Mng'omba, S., Du Toit, E., Akinnifesi, F., Venter, H., **2007**. Histological evaluation of early graft compatibility in *Uapaca kirkiana* Muell Arg. Scion/ stock combinations. *Hortic. Sci.*, 42 (3), 1–5.
- Mng'omba S., Toit E. and Akinnifesi F., **2008**. The relationship between graft incompatibility and phenols in *Uapaca kirkiana* Muell Arg. *Sci. Hortic.*, 117, 212–218.
- Moing, A., **1987**. Growth and the composition and transport of carbohydrate in compatible and incompatible peach plum grafts. *Tree Physiology*, 3(4), 345-353.
- Moore R, Walker D., **1981**. Studies on vegetative compatibility–incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (Crassulaceae) and *Solanum pennelli* (Solanaceae). *Am. J. Bot.*, 68, 831–842.

- Moore R, Walker D., **1983**. Studies of vegetative compatibility–incompatibility in higher plants VI. Grafting of *Sedum* and *Solanum* callus tissue in vitro. *Protoplasma*, 115, 114–121.
- Moore R., **1984**. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. *Am. J. Bot.* 71, 752–758.
- Moreno, M.,**1993**. Peach/myrabolan plum graft incompatibility in the nurse. *J. of Hortic. Sci.*, 68, 705-714.
- Mosse B. , Herrero J. **1954**. Studies on incompatibility between some pear and quince grafts. *Hort. Sci.*, 26, 238–245.
- Mosse, B., **1958**. Further observation on growth and union structure of double grafted pear on quince. *J. of Hortic. Sci.*, 33,186-193.
- Mosse B. **1962**. “Graft incompatibility in fruit trees”. *Tech Commun Commonw Bur Hortic Plant Crops*, 28, 1–36.
- Niklowitz W., **1954**. Histologische studien an reblausgallen und reblausabwehrnekrosen. *Phytopathology*, 24, 299-340.
- Nocito F., Espen L., Fedeli C., Lancilli C., Musacchi S., Serra S., Sansavini S., Cocucci M., Sacchi G., **2010**. Oxidative stress and senescence-like status of pear calli co-cultured on suspensions of incompatible quince microcalli. *Tree Physiol*, 30, 450–458.
- Oda, M.,Maruyama, M.,Mori, G., **2005**. Water transfer at graft union of tomato plants grafted onto *Solanum* rootstocks. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 74, 458 – 463.
- OIV, **1990**. Reweil des methodes d’analyse des vins et moûts. OIV, Paris, p 368.
- Pietta P., **2000**. Flavonoids as antioxidants. *J. of Nat. Produc.*, 63, 1035-1042.
- Pimpão R., **2009**. Compostos fenólicos e sua atividade antioxidante em espécies de *Juniperus*: Análise da produção sazonal e sob condições de stresse. *Universidade de Lisboa -Faculdade de Ciências*.
- Pina A., Errea P., **2005**. A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. *Sci. Hortic.*, 106, 1–11.
- Pina A., Errea P. **2008**. Influence of graft incompatibility on gene expression and enzymaticactivity of UDP-glucose pyrophosphorylase . *Plant Sci.*, 174, 502–509.
- Pina A., Errea P, Schulz A., Martens H., **2009**. Cell-to-cell transport through plasmodesmata in tree callus cultures. *Tree Physiol.*, 29,809–818.
- Pina A., Errea P., Martens H., **2012**. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of *Prunus* spp. *Sci Hortic.*, 143,144–150.

- Quessada M., Macheix, J., **1984**. Caracterisation d'une peroxidase impliquee specifiquement dans la lignification en relation avec l'incompatibilite au greffage chez l'abricotier. *Physiol. Veg.*, 22, 533-540.
- Rasmann S., Köllner T., Degenhardt J., Hiltbold I., Toepfer S., Kuhlmann U., Gershenzon J., Turlings T., **2005**. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434, 732-737.
- Regina M., **2002**. Produção e Certificação de Mudras de Videira em França. *Rev. Bras. Frutic.*, 24,(2), 590-596.
- Rieger R. , Michaelis A. , Green M. .2013. A Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular. *Springer*, ISBN 978-3-662-01012-9.
- Rhodes M., Woollorton L., **1978**. The biosynthesis of phenolic compounds in wounded plant storage tissues. In *Biochemistry of Wounded Plant Tissues* (Kahl, G., ed.), pp. 243-286.
- Robards K., Antolovich M., **1997**. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review. *Analyst*, 122, 11-34.
- Ross J, Kasum C., **2002**. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann. Rev. of Nutrition*, 22, 19-34.
- Ruiz, J.M., Belakbir, A., López-Cantarero, I., Romero, L., **1997**. Leaf-macronutrient content and yield in grafted melon plants: a model to evaluate the influence of rootstock genotype. *Sci. Hortic.*, 71, 227–234.
- Santarosa E., Souza P., Mariath J. e Lourosa G., **2016**. Alterações anatômicas do sistema vascular em porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(4), 320-329.
- Santos-Buelga C, Scalbert A., **2000**. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 80, 1094-1117.
- Schaefer H., Metabolite differences between Phylloxera root galls and healthy grapevine roots, **1985**. *Wein-Wissenschaft*, 40, 219-227.
- Schmid P., Feucht W., **1981**. Differentiation of sieve tubes in compatible and incompatible *Prunus* graftings. *Sci Hortic.*, 15, 349–354
- Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K., **2007**. Regulatory metabolic networks in drought stress responses, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 10, 296-302.
- Shrivastava A. E Gupta V., **2011**. Methods for determination of limit detection and limit of quantification of analytical methods. *Chron Young, Sci.*, 2, 21-25

- Simons R., **1987**. Compatibility and stock-scion interactions as related to dwarfing. In: Rom RC, Carlson RF (eds) *Rootstocks for Fruit Crops. Chap. 3. Wiley & Sons*, New York, NY, pp 79–106. ISBN 0-471-80551-80553.
- Slatnar, A., Mikulič-Petkovšek, M., Halbwirth, H., Štampar, F., Stich, K., Veberič, R., **2012**: Polyphenol metabolism of developing apple skin of a scab resistant and a susceptible apple cultivar. *Trees – Structure and Function*, 26, 109–119.
- Slatnar A., Mikulic-Petkovsek M., Veberic R., Štampar F., **2016**. Research on the involvement of phenolics in the defence of horticultural plants. *Acta agriculturae Slovenica*, 107 - 1, 183 - 189
- Somelidou, K., Morris, D., Battey N., Barnett J., **1994**. The anatomy the developing dud union and its relationship to dwarfing in apple. *Ann. Bot.*, 74, 605 – 611.
- Strack D., **1997**. Phenolic metabolism. In: Dey P.M. Harborne J.B. (eds). *Plant Biochemistry*, pp. 387- 416. *Academic Press*, London.
- Taiz L., Zeiger E., **2002**. *Plant Physiology*, Third edition. *Sinauer Associates Inc.* Sunderland, USA.
- Treutter P., Feucht D., **1994**. Characterisation of flavanol type polyphenols in apricot cultivar and rootstocks. *Adv Hortic. Sci.*, 8, 165–169
- Treutter, D., **2006**: Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Env. Chem. Lett.*, 4, 147–57.
- Trinchera A., Pandozy G., Rinaldi S., Crino P., Temperini O., Rea E., **2013**. Graft union formation in artichoke grafting onto wild and cultivated cardoon: an anatomical study. *J. Plant Physiol.*, 170, 1569–1578.
- Tomaz Z., Rodrigues A., Verissimo V., Marafon A., Herter F., Rufato A. **2009**. Compatibility of pear cultivars on quinces rootstocks. *Rev Bras Frutic*; 31, 1211–1217.
- Tucker D., Lamb D., Powell K., Blanchfield A., Brereton I., **2007**. Detection of phylloxera infestation in grapevines by NMR methods, *Act. Hortic.*, 733, 173-181.
- Usenik, V., Stampar, F., **2000**. Influence of various rootstocks for cherries on p-coumaric acid, genistein and pruning content and their involvement in the graft incompatibility process. *Gartenbauwissenschaft*, 65 (6), 245– 250.
- Usenik, V., Stampar, F., **2001**. Different rootstocks for cherries—influence on polyphenol content and graft incompatibility. *Act. Hortic.*, 557, 175–179.
- Usenik, V., Krs̃ka, B., Vic̃an, M., Stampar, F., **2006**. Early detection of graft incompatibility apricots (*Prunus amerniaca* L.) using phenol analyses. *Sci. Hortic.*, 109, 332–338.

- Wallis C., Chen J., **2012**. Grapevine Phenolic Compounds in Xylem Sap and Tissues Are Significantly Altered During Infection by *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, 102, 816- 826.
- Wallis C., Wallingford A., Chen J., **2013**. Effects of cultivar, phenology, and *Xylella fastidiosa* infection on grapevine xylem sap and tissue phenolic content. *Phys. Mol. Plant Path.*, 84, 28-35.
- Wang Y. and Kollmann R., **1996**. Vascular differentiation in the graft union of in-vitro grafts with different compatibility. Structural and functional aspects. *J Plant Physiol.*, 147, 521–533
- Wang Y., **2011**. Plant grafting and its application in biological research. *Chin. Sci. Bull.*, 56, 3511–3517.
- Wareing P., **1958**. Interaction between indole-acetic acid and gibberellic acid in cambial activity. *Nature Biotech.*, 181, 1744–1745.
- Warmund M., Starbuck C., Lockshin L., **1986**. Growth, cold hardiness and carbohydrate content of Vidal blanc grapevines propagated by hardwood vs. softwood cuttings. *Am. J. of En. and Vitic.*, 37, 215-219.
- Winkel-Shirley B., **2002**. Biosynthesis of flavanoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.
- Yin H, Yan B, Sun J, Jia PF, Zhang ZJ, Yan XS, Chai J, Ren ZZ, Zheng GC, Liu H. **2012**. Graft-union development: a delicate process that involves cell–cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. *J. of Exp. Botany* 63, 4219–4232.
- Zarrouk, O., **2010**. Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations. *J. of the Am. Society for Hortic. Sci.*, 135, 9-17.
- Zhao J., Davis L., Verpoorte R., **2005**. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotech. Adv.*, 23, 283-333.
- Zheng BS, Chu HL, Jin SH, Huang YJ, Wang ZJ, Chen M, Huang J., **2010**. cDNA-AFLP analysis of gene expression in hickory (*Carya cathayensis*) during graft process. *Tree Phys.*, 30, 297–303.
- Zotov, V., **1954**. Characteristics of carbohydrate metabolism in the roots of grapes infected with *Phylloxera*. *Biokhimiya*, 19, 649-651.

Anexos

Quadro A.1 – Tempos de retenção relativos dos compostos fenólicos identificados nas combinações **A** e **B**, para as três secções e para todo o ciclo de enxertia.

Tempo de retenção/área		TR relativo (PI)
280 nm	Ác. gálgico	0,48
	Catequina	1,10
	Epicatequina	1,42
	Ác. ferulico	1,90
fluor	Ác. clorogénico	0,71
	Ác. cafeico	0,75
	Ác. sinápico	1,09

Quadro A.2 – Áreas dos picos cromatográficos correspondente à combinação **A** (TN 112/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.

Secção	Tempo	Amostra	Ac. gálhico	Catequi na	Epicate quina	Ac. ferúlico	Ac. cafeico	Ac clorogé nico	Ac. sinápico
Acima	Calogéne se	A1a1_I	18802	125565	46437	6494	13165	4364	1065590
		A1a1_II	17676	134722	48720	14323	10707	3207	750453
		A1a2_I	31611	152963	4258	42953	10707	3207	750453
		A1a2_II	28365	116130	50475	9210	14678	2998	875000
		A1a3_I	15365	153679	66516	4876	10617	12509	1791208
		A1a3_II	21679	178463	55441	6493	11159	11672	1722883
abaixo		A1b1_I	24152	113979	22756	5689	5289	2910	170834
		A1b1_II	47974	184301	37516	11452	27259	6838	571401
		A1b2_I	62613	184904	39495	14263	9621	4982	859523
		A1b2_II	47239	155831	32587	7484	10575	5613	807115
		A1b3_I	46412	232656	44805	14321	3377	6939	2074779
		A1b3_II	33786	215534	36549	13403	8248	10999	2337450
união		A1e1_I	98356	140704	13840	11409	23383	6674	967071
		A1e1_II	90922	151431	7707	14067	25460	6254	1562013
		A1e2_I	81252	159938	15295	17495	22889	6646	1649865
		A1e2_II	74963	155176	14174	17060	29414	5867	1566380
		A1e3_I	85158	169092	10660	13052	10351	7160	2473763
		A1e3_II	72598	171270	9579	15625	18851	20430	2558570
acima	Enraizame nto	A2a1_I	7241	107270	24007	7940	21106	9006	1111198
		A2a1_II	7904	126440	24165	1489	33333	1462	1134881
		A2a2_I	28125	144255	5275	2977	22550	910	1125899
		A2a2_II	18493	114927	30099	13343	19598	901	1002192
		A2a3_I	16207	133143	29533	1324	25168	976	1283793
		A2a3_II	10026	100917	24741	50865	19369	729	1027908
abaixo		A2b1_I	51674	145945	18204	4430	54801	1438	1104109
		A2b1_II	43408	169904	15786	1020	47395	2609	1123797
		A2b2_I	39514	136770	37579	3459	33085	1654	585836
		A2b2_II	40266	113630	28754	4414	40457	1399	472417
		A2b3_I	21709	81650	11494	5351	12056	1201	722792
		A2b3_II	27704	78631	11551	4450	12096	1158	878628
união		A2e1_I	88656	234966	8091	6175	98162	2502	3149765
		A2e1_II	79277	189561	7694	4718	90336	1285	1990000
		A2e2_I	78314	213861	11473	4185	88863	1202	1483842
		A2e2_II	74291	208278	10168	3157	79358	1097	1559256
		A2e3_I	71601	107027	5587	4070	34701	1862	1932302
		A2e3_II	69478	109773	3103	2393	32472	1221	1553913
acima	Final de Ciclo	A3a1_I	20521	74805	52694	35678	54075	2096	20567012
		A3a1_II	19843	82660	46819	5852	56341	2615	18262902
		A3a2_I	28148	69152	72351	2294	44071	1163	12119063
		A3a2_II	23563	65037	64009	9301	13498	1388	13152860
		A3a3_I	9246	56171	37141	2221	10842	1252	1744965
		A3a3_II	9794	76060	42339	1488	14193	1276	1645827
abaixo		A3b1_I	9122	132148	32234	10479	39913	2351	3136275
		A3b1_II	9840	128062	30347	13202	46094	3671	3185353
		A3b2_I	25814	113219	42896	6379	103597	5364	3950950
		A3b2_II	24371	95674	33866	9571	94869	6108	3169571
		A3b3_I	31244	72483	32793	5647	83109	5498	2026800
		A3b3_II	28997	66297	24384	7149	80437	4522	1326290

união		A3e1_I	31810	64500	60511	25960	62356	2924	8890779
		A3e1_II	36208	66182	57533	32772	77303	2452	11290496
		A3e2_I	24235	51841	47465	9309	75664	3069	2235686
		A3e2_II	24129	50261	43507	8051	55125	2584	2125960
		A3e3_I	27232	53385	51312	8332	43210	2941	1937183
		A3e3_II	27469	36205	47465	11506	50357	2841	1197878

Quadro A.3 – Áreas dos picos cromatográficos correspondente à combinação **B** (TN 21/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.

Secção	Tempo	Amostra	Ac. gálhico	Catequina	Epicatequina	Ac. ferúlico	Ac. cafeico	Ac clorogénico	Ac. sinápico
acima	Calogénese	B1a1_I	22450	133856	46962	5885	23446	7959	1135476
		B1a1_II	20131	124936	50787	4382	19319	6943	970598
		B1a2_I	31339	175879	48311	3960	46392	13396	1209141
		B1a2_II	50914	179952	88568	7874	40542	9593	689624
		B1a3_I	30086	115111	50578	2489	29695	6443	965656
		B1a3_II	22409	147072	44163	5680	47573	7057	1667612
abaixo		B1b1_I	42774	197517	54456	9495	29695	6443	965656
		B1b1_II	71026	222323	62054	9428	33547	6163	890564
		B1b2_I	27373	148585	27813	6721	37308	16216	1808954
		B1b2_II	33916	235298	92933	6531	36413	9187	1070320
		B1b3_I	38262	202001	75613	8945	14446	13853	1232400
		B1b3_II	28182	188258	55815	7272	20913	13424	1131863
união		B1e1_I	73054	147880	11408	11654	30696	7919	1377292
		B1e1_II	79839	153264	13722	11335	28753	7809	1244524
		B1e2_I	60869	185762	21479	11800	41836	21640	2604350
		B1e2_II	87407	193607	13823	17446	36369	18130	2368436
		B1e3_I	88501	188430	23780	26065	38357	12846	1872153
		B1e3_II	72514	168232	15361	12077	35869	13407	1630362
acima	Enraizamento	B2a1_I	44072	145145	28681	1752	30663	135	1617167
		B2a1_II	27140	111289	21733	7013	25816	1200	1207121
		B2a2_I	28673	127823	18911	1071	28494	697	517256
		B2a2_II	23534	107084	17605	2983	21021	930	461516
		B2a3_I	28521	101185	19897	8222	22900	1342	604128
		B2a3_II	27798	95368	11946	3307	22307	606	726068
abaixo		B2b1_I	28761	63210	23417	4866	46751	2634	490086
		B2b1_II	38723	81511	19486	6366	50050	2598	456132
		B2b2_I	28934	80674	28862	3768	19422	1810	844240
		B2b2_II	19306	61883	24707	6467	20180	2217	691164
		B2b3_I	30885	81379	17727	7556	15986	843	454612
		B2b3_II	22870	87080	17971	7434	21701	1140	513899
união		B2e1_I	54402	97324	4172	4260	64814	1194	1140938
		B2e1_II	50795	99047	3037	2742	65863	1116	1104440
		B2e2_I	73986	103373	2927	6508	70732	1897	2325565
		B2e2_II	58347	75644	2428	3770	65092	1638	1971395
		B2e3_I	73055	92098	849	1693	65135	1536	1666338
		B2e3_II	68615	97749	978	3512	61144	1276	2218987
acima	Final de Ciclo	B3a1_I	17019	73491	59540	5934	20595	1157	624624
		B3a1_II	15945	53858	47863	5518	15053	1172	553545
		B3a2_I	9180	66494	46877	5137	14388	1011	152644
		B3a2_II	10115	58218	40339	2430	15405	741	142767
		B3a3_I	13689	64013	32534	5085	17819	879	1380679
		B3a3_II	14206	62060	36375	3425	15645	1157	706225
abaixo		B3b1_I	18392	107619	39280	2473	65672	3805	2520599
		B3b1_II	8803	70738	29305	5216	56654	2451	1354596
		B3b2_I	12973	86131	28522	4732	84354	4556	1321291
		B3b2_II	12808	83069	29074	6209	87507	5100	1285749
		B3b3_I	13688	75675	19813	4288	87127	5153	1336794
		B3b3_II	18399	81861	25084	7429	101491	5376	1381081
união		B3e1_I	21355	47784	42728	6761	37711	2667	769004
		B3e1_II	22528	48313	37135	8315	47976	2339	1195256
		B3e2_I	25718	77838	44854	8788	93996	4980	1278123
		B3e2_II	18663	54486	34922	7761	69945	3581	537460
		B3e3_I	18630	39785	41826	5495	61272	3524	721793
		B3e3_II	25320	57558	44007	10277	71618	2011	986995

Quadro A.4 – Áreas corrigidas (sem aberrantes) dos picos cromatográficos correspondente à combinação **A** (TN 112/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.

Secção	Tempo	Amostra	Ác. gálhico	Catequina	Epicatequina	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Ác clorogénico	Ác. sinápico
Acima	Calogénese	A1a1_I	18802	125565	46437	6494	13165	4364	1065590
		A1a1_II	17676	134722	48720	14323	10707	3207	750453
		A1a2_I	31611	152963	4258		10707	3207	750453
		A1a2_II	28365	116130	50475	9210	14678	2998	875000
		A1a3_I	15365	153679	66516	4876	10617	12509	1791208
		A1a3_II	21679	178463	55441	6493	11159	11672	1722883
		A1b1_I	24152	113979	22756	5689	5289	2910	170834
		A1b1_II	47974	184301	37516	11452		6838	571401
		A1b2_I	62613	184904	39495	14263	9621	4982	859523
		A1b2_II	47239	155831	32587	7484	10575	5613	807115
		A1b3_I	46412	232656	44805	14321	3377	6939	2074779
		A1b3_II	33786	215534	36549	13403	8248	10999	2337450
		A1e1_I	98356	140704	13840	11409	23383	6674	967071
		A1e1_II	90922	151431	7707	14067	25460	6254	1562013
		A1e2_I	81252	159938	15295	17495	22889	6646	1649865
		A1e2_II	74963	155176	14174	17060	29414	5867	1566380
		A1e3_I	85158	169092	10660	13052	10351	7160	2473763
		A1e3_II	72598	171270	9579	15625	18851	20430	2558570
acima	Enraizamento	A2a1_I	7241	107270	24007	7940	21106		1111198
		A2a1_II	7904	126440	24165	1489	33333	1462	1134881
		A2a2_I	28125	144255	5275	2977	22550	910	1125899
		A2a2_II	18493	114927	30099	13343	19598	901	1002192
		A2a3_I	16207	133143	29533	1324	25168	976	1283793
		A2a3_II	10026	100917	24741	50865	19369	729	1027908
		A2b1_I	51674	145945	18204	4430	54801	1438	1104109
		A2b1_II	43408	169904	15786	1020	47395	2609	1123797
		A2b2_I	39514	136770	37579	3459	33085	1654	585836
		A2b2_II	40266	113630	28754	4414	40457	1399	472417
		A2b3_I	21709	81650	11494	5351	12056	1201	722792
		A2b3_II	27704	78631	11551	4450	12096	1158	878628
		A2e1_I	88656	234966	8091	6175	98162	2502	3149765
		A2e1_II	79277	189561	7694	4718	90336	1285	1990000
		A2e2_I	78314	213861	11473	4185	88863	1202	1483842
		A2e2_II	74291	208278	10168	3157	79358	1097	1559256
		A2e3_I	71601	107027	5587	4070	34701	1862	1932302
		A2e3_II	69478	109773	3103	2393	32472	1221	1553913
acima	Final de Ciclo	A3a1_I	20521	74805	52694	35678	54075	2096	20567012
		A3a1_II	19843	82660	46819	5852		2615	18262902
		A3a2_I	28148	69152	72351	2294	44071	1163	12119063
		A3a2_II	23563	65037	64009	9301	13498	1388	13152860
		A3a3_I	9246	56171	37141	2221	10842	1252	1744965
		A3a3_II	9794	76060	42339	1488	14193	1276	1645827
		A3b1_I	9122	132148	32234	10479	39913	2351	3136275
		A3b1_II	9840	128062	30347	13202	46094	3671	3185353
		A3b2_I	25814	113219	42896	6379	103597	5364	3950950
		A3b2_II	24371	95674	33866	9571	94869	6108	3169571
		A3b3_I	31244	72483	32793	5647	83109	5498	2026800
		A3b3_II	28997	66297	24384	7149	80437	4522	1326290
		A3e1_I	31810	64500	60511	25960	62356	2924	8890779
		A3e1_II	36208	66182	57533	32772	77303	2452	11290496
		A3e2_I	24235	51841	47465	9309	75664	3069	2235686
		A3e2_II	24129	50261	43507	8051	55125	2584	2125960
		A3e3_I	27232	53385	51312	8332	43210	2941	1937183
		A3e3_II	27469	36205	47465	11506	50357	2841	1197878

(*) – As células do quadro sem valor numérico resultam da eliminação desses valores por terem sido considerados aberrantes após aplicação do Teste de Grubbs

Quadro A.5 – Áreas corrigidas (sem aberrantes) dos picos cromatográficos correspondente à combinação **B** (TN 21/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.

Secção	Tempo	Amostra	Ac. gálhico	Catequina	Epicatequina	Ac. ferúlico	Ac. cafeico	Ac clorogénico	Ac. sinápico
acima	Calogénese	B1a1_I	22450	133856	46962	5885	23446	7959	1135476
		B1a1_II	20131	124936	50787	4382	19319	6943	970598
		B1a2_I	31339	175879	48311	3960	46392	13396	1209141
		B1a2_II	50914	179952	88568	7874	40542	9593	689624
		B1a3_I	30086	115111	50578	2489	29695	6443	965656
		B1a3_II	22409	147072	44163	5680	47573	7057	1667612
	abaixo	B1b1_I	42774	197517	54456	9495	29695	6443	965656
		B1b1_II	71026	222323	62054	9428	33547	6163	890564
		B1b2_I	27373	148585	27813	6721	37308	16216	1808954
		B1b2_II	33916	235298	92933	6531	36413	9187	1070320
		B1b3_I	38262	202001	75613	8945	14446	13853	1232400
		B1b3_II	28182	188258	55815	7272	20913	13424	1131863
união		B1e1_I	73054	147880	11408	11654	30696	7919	1377292
		B1e1_II	79839	153264	13722	11335	28753	7809	1244524
		B1e2_I	60869	185762	21479	11800	41836	21640	2604350
		B1e2_II	87407	193607	13823	17446	36369	18130	2368436
		B1e3_I	88501	188430	23780	26065	38357	12846	1872153
		B1e3_II	72514	168232	15361	12077	35869	13407	1630362
acima	Enraizamento	B2a1_I	44072	145145	28681	1752	30663	135	1617167
		B2a1_II	27140	111289	21733	7013	25816	1200	1207121
		B2a2_I	28673	127823	18911	1071	28494	697	517256
		B2a2_II	23534	107084	17605	2983	21021	930	461516
		B2a3_I	28521	101185	19897	8222	22900	1342	604128
		B2a3_II	27798	95368	11946	3307	22307	606	726068
	abaixo	B2b1_I	28761	63210	23417	4866	46751	2634	490086
		B2b1_II	38723	81511	19486	6366	50050	2598	456132
		B2b2_I	28934	80674	28862	3768	19422	1810	844240
		B2b2_II	19306	61883	24707	6467	20180	2217	691164
		B2b3_I	30885	81379	17727	7556	15986	843	454612
		B2b3_II	22870	87080	17971	7434	21701	1140	513899
união		B2e1_I	54402	97324	4172	4260	64814	1194	1140938
		B2e1_II	50795	99047	3037	2742	65863	1116	1104440
		B2e2_I	73986	103373	2927	6508	70732	1897	2325565
		B2e2_II	58347	75644	2428	3770	65092	1638	1971395
		B2e3_I	73055	92098	849	1693	65135	1536	1666338
		B2e3_II	68615	97749	978	3512	61144	1276	2218987
acima	Final de Ciclo	B3a1_I	17019	73491	59540	5934	20595	1157	624624
		B3a1_II	15945	53858	47863	5518	15053	1172	553545
		B3a2_I	9180	66494	46877	5137	14388	1011	152644
		B3a2_II	10115	58218	40339	2430	15405	741	142767
		B3a3_I	13689	64013	32534	5085	17819	879	1380679
		B3a3_II	14206	62060	36375	3425	15645	1157	706225
	abaixo	B3b1_I	18392	107619	39280	2473	65672	3805	2520599
		B3b1_II	8803	70738	29305	5216	56654	2451	1354596
		B3b2_I	12973	86131	28522	4732	84354	4556	1321291
		B3b2_II	12808	83069	29074	6209	87507	5100	1285749
		B3b3_I	13688	75675	19813	4288	87127	5153	1336794
		B3b3_II	18399	81861	25084	7429	101491	5376	1381081
união		B3e1_I	21355	47784	42728	6761	37711	2667	769004
		B3e1_II	22528	48313	37135	8315	47976	2339	1195256
		B3e2_I	25718	77838	44854	8788	93996	4980	1278123
		B3e2_II	18663	54486	34922	7761	69945	3581	537460
		B3e3_I	18630	39785	41826	5495	61272	3524	721793
		B3e3_II	25320	57558	44007	10277	71618	2011	986995

(*) – As células do quadro sem valor numérico resultam da eliminação desses valores por terem sido considerados aberrantes após aplicação do Teste de Grubbs

Quadro A.6 – Concentrações dos compostos fenólicos (mg/L) correspondentes à combinação A (TN 112/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.

Secção	Tempo	Amostra	Ác. gálhico	Catequina	Epicatequina	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Ác. clorogénico	Ác. sinápico
Acima	Calogénese	A1a1_I	0,53	13,22	4,74	0,17	0,4	0,14	5,54
		A1a1_II	0,5	14,16	4,97	0,36	0,33	0,11	3,9
		A1a2_I	0,85	16,04	0,55		0,33	0,11	3,9
		A1a2_II	0,77	12,24	5,14	0,23	0,44	0,1	4,55
		A1a3_I	0,45	16,11	6,73	0,13	0,32	0,37	9,33
		A1a3_II	0,6	18,67	5,63	0,17	0,34	0,34	8,97
		A1b1_I	0,67	12,02	2,39	0,15	0,17	0,1	0,88
		A1b1_II	1,26	19,27	3,86	0,29		0,19	2,97
		A1b2_I	1,63	19,33	4,05	0,36	0,3	0,14	4,47
		A1b2_II	1,25	16,34	3,37	0,19	0,32	0,16	4,2
abaixo		A1b3_I	1,22	24,25	4,58	0,36	0,11	0,19	10,8
		A1b3_II	0,91	22,49	3,76	0,33	0,26	0,31	12,17
união		A1e1_I	2,53	14,78	1,51	0,29	0,7	0,21	5,03
		A1e1_II	2,34	15,88	0,9	0,35	0,76	0,19	8,13
		A1e2_I	2,1	16,76	1,65	0,43	0,68	0,2	8,59
		A1e2_II	1,94	16,27	1,54	0,42	0,87	0,18	8,15
		A1e3_I	2,2	17,7	1,19	0,33	0,32	0,22	12,88
acima	Enraizamento	A1e3_II	1,88	17,93	1,08	0,39	0,57	0,59	13,33
		A2a1_I	0,24	11,33	2,51	0,2	0,63		5,78
		A2a1_II	0,26	13,31	2,53	0,04	0,99	0,06	5,9
		A2a2_I	0,77	15,14	0,66	0,08	0,67	0,04	5,86
		A2a2_II	0,52	12,12	3,12	0,33	0,59	0,04	5,21
		A2a3_I	0,47	14	3,06	0,04	0,75	0,05	6,68
		A2a3_II	0,31	10,68	2,59		0,58	0,04	5,35
		A2b1_I	1,36	15,32	1,94	0,12	1,62	0,06	5,74
		A2b1_II	1,15	17,79	1,7	0,03	1,4	0,09	5,85
		A2b2_I	1,05	14,37	3,86	0,09	0,98	0,06	3,04
abaixo		A2b2_II	1,07	11,99	2,99	0,11	1,2	0,06	2,45
		A2b3_I	0,61	8,69	1,27	0,14	0,37	0,05	3,76
		A2b3_II	0,76	8,38	1,28	0,12	0,37	0,05	4,57
união		A2e1_I	2,28	24,49	0,93	0,16	2,89	0,09	16,41
		A2e1_II	2,05	19,81	0,9	0,12	2,66	0,05	10,36
		A2e2_I	2,02	22,32	1,27	0,11	2,61	0,05	7,72
		A2e2_II	1,92	21,74	1,14	0,08	2,34	0,05	8,12
		A2e3_I	1,86	11,3	0,69	0,11	1,03	0,07	10,06
acima	Final de Ciclo	A2e3_II	1,8	11,59	0,44	0,07	0,96	0,05	8,09
		A3a1_I	0,58	7,98	5,36		1,6	0,08	
		A3a1_II	0,56	8,79	4,78	0,15	1,66	0,09	
		A3a2_I	0,77	7,4	7,31	0,06	1,3	0,05	
		A3a2_II	0,65	6,98	6,49	0,23	0,41	0,06	
		A3a3_I	0,29	6,06	3,82	0,06	0,33	0,05	9,09
		A3a3_II	0,31	8,11	4,33	0,04	0,43	0,05	8,57
		A3b1_I	0,29	13,89	3,33	0,26	1,18	0,08	16,34
		A3b1_II	0,31	13,47	3,14	0,33	1,36	0,12	16,59
		A3b2_I	0,71	11,94	4,39	0,16	3,04	0,17	20,59
abaixo		A3b2_II	0,67	10,13	3,49	0,24	2,79	0,19	16,51
		A3b3_I	0,84	7,74	3,39	0,14	2,44	0,17	10,55
		A3b3_II	0,79	7,11	2,55	0,18	2,37	0,15	6,9
união		A3e1_I	0,86	6,92	6,14	0,64	2,28	0,1	
		A3e1_II	0,97	7,09	5,84	0,81	2,28	0,09	
		A3e2_I	0,67	5,62	4,84	0,23	2,23	0,1	11,64
		A3e2_II	0,67	5,45	4,45	0,2	1,63	0,09	11,07
		A3e3_I	0,74	5,78	5,22	0,21	1,28	0,1	10,09
		A3e3_II	0,75	4	4,84	0,29	1,49	0,1	6,23

(*) – As células do quadro sem valor numérico resultam da eliminação desses valores por terem sido considerados aberrantes após aplicação do Teste de Grubbs

Quadro A.7 – Concentrações dos compostos fenólicos (mg/L) correspondentes à combinação **B** (TN 21/110 R), para as três secções e para os três estágios do ciclo de enxertia.

Secção	Tempo	Amostra	Ác. gálhico	Catequina	Epicatequin a	Ác. ferúlico	Ác. cafeico	Ác clorogénico	Ác. sinápico
acima	Calogénese	B1a1_I	0,62	14,07	4,79	0,18	0,67	0,26	5,91
		B1a1_II	0,57	13,15	5,17	0,14	0,56	0,24	5,05
		B1a2_I	0,85	18,4	4,93	0,12	1,31	0,4	6,29
		B1a2_II	1,34	18,82	8,92	0,24	1,15	0,3	3,58
		B1a3_I	0,82	12,14	5,15	0,08	0,85	0,22	5,02
		B1a3_II	0,62	15,43	4,52	0,17	1,35	0,24	8,68
abaixo		B1b1_I	1,13	20,63	5,54	0,29	0,85	0,22	5,02
		B1b1_II	1,84	23,19	6,29	0,28	0,96	0,22	4,63
		B1b2_I	0,75	15,59	2,89	0,2	1,06	0,47	9,42
		B1b2_II	0,91	24,53	9,36	0,2	1,04	0,29	5,57
		B1b3_I	1,02	21,09	7,64	0,27	0,42	0,41	6,41
		B1b3_II	0,77	19,68	5,67	0,22	0,6	0,4	5,89
união		B1e1_I	1,89	15,52	1,26	0,35	0,88	0,26	7,17
		B1e1_II	2,06	16,07	1,49	0,34	0,82	0,26	6,48
		B1e2_I	1,59	19,42	2,26	0,35	1,19	0,6	13,57
		B1e2_II	2,25	20,23	1,5	0,52	1,03	0,52	12,34
		B1e3_I	2,28	19,7	2,49	0,77	1,09	0,38	9,75
		B1e3_II	1,88	17,61	1,66	0,36	1,02	0,4	8,49
acima	Enraizamento	B2a1_I	1,17	15,23	2,98	0,05	0,91	0,02	8,42
		B2a1_II	0,74	11,74	2,29	0,18	0,77	0,05	6,28
		B2a2_I	0,78	13,45	2,01	0,03	0,85	0,04	2,68
		B2a2_II	0,65	11,31	1,88	0,08	0,63	0,04	2,39
		B2a3_I	0,78	10,7	2,11	0,21	0,68	0,06	3,14
		B2a3_II	0,76	10,1	1,32	0,09	0,67	0,04	3,77
abaixo		B2b1_I	0,78	6,79	2,46	0,13	1,38	0,09	2,54
		B2b1_II	1,03	8,67	2,07	0,16	1,48	0,09	2,37
		B2b2_I	0,79	8,59	3,00	0,1	0,58	0,07	4,39
		B2b2_II	0,55	6,65	2,58	0,16	0,6	0,08	3,59
		B2b3_I	0,84	8,66	1,89	0,19	0,48	0,04	2,36
		B2b3_II	0,63	9,25	1,92	0,19	0,65	0,05	2,67
união		B2e1_I	1,43	10,3	0,55	0,11	1,91	0,05	5,94
		B2e1_II	1,33	10,48	0,43	0,07	1,94	0,05	5,75
		B2e2_I	1,92	10,93	0,42	0,17	2,08	0,07	12,11
		B2e2_II	1,52	8,07	0,37	0,1	1,92	0,06	10,27
		B2e3_I	1,89	9,77	0,22	0,05	1,92	0,06	8,68
		B2e3_II	1,78	10,35	0,23	0,09	1,8	0,05	11,56
acima	Final de Ciclo	B3a1_I	0,49	7,85	6,04	0,15	0,62	0,05	3,24
		B3a1_II	0,46	5,82	4,88	0,14	0,45	0,05	2,87
		B3a2_I	0,29	7,13	4,78	0,13	0,44	0,05	0,78
		B3a2_II	0,31	6,27	4,14	0,07	0,46	0,04	0,73
		B3a3_I	0,4	6,87	3,36	0,13	0,54	0,04	7,19
		B3a3_II	0,42	6,67	3,74	0,09	0,47	0,05	3,67
abaixo		B3b1_I	0,52	11,37	4,03	0,07	1,93	0,13	13,13
		B3b1_II	0,28	7,56	3,04	0,13	1,67	0,09	7,05
		B3b2_I	0,39	9,15	2,96	0,12	2,48	0,15	6,88
		B3b2_II	0,38	8,84	3,02	0,16	2,57	0,16	6,69
		B3b3_I	0,4	8,07	2,1	0,11	2,56	0,16	6,96
		B3b3_II	0,52	8,71	2,62	0,19	2,98	0,17	7,19
união		B3e1_I	0,6	5,2	4,37	0,17	1,12	0,09	4,0
		B3e1_II	0,63	5,25	3,82	0,21	1,42	0,08	6,22
		B3e2_I	0,71	8,3	4,58	0,22	2,76	0,16	6,65
		B3e2_II	0,53	5,89	3,6	0,2	2,06	0,12	2,79
		B3e3_I	0,53	4,37	4,28	0,14	1,81	0,12	3,75
		B3e3_II	0,7	6,21	4,5	0,26	2,11	0,07	5,13

(*) – As células do quadro sem valor numérico resultam da eliminação desses valores por terem sido considerados aberrantes após aplicação do Teste de Grubbs